

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Estudio de la capacidad de regeneración ósea de implantes microporosos de Titanio procesados mediante Robocasting

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco Javier Merino Domingo

DIRECTORES

Ana Isabel Flores de la Cal
Elena Gordo Oderiz

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Estudio de la capacidad de regeneración ósea de implantes microporosos de Titanio procesados mediante Robocasting.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco Javier Merino Domingo

Directores

Ana Isabel Flores de la Cal

Elena Gordo Oderiz

Tutor

Carmelo Loinaz Seguro

Madrid, 2020

AGRADECIMIENTOS

El inicio de toda tesis doctoral es un camino tan arduo como ilusionante, tengo que agradecer en primer lugar a la persona que me introdujo en la cabeza la idea de poder llevar a cabo un trabajo de investigación y mirar más allá de lo que podía ver en ese momento. José Antonio Ortiz Reina, no solo eres un maestro sino mi amigo y te estaré eternamente agradecido por tu apoyo y amistad.

Todo este camino no hubiera sido posible sin apoyarme en la ayuda de gigantes de sus respectivos campos como han sido mis directoras de tesis, Ana Flores y Elena Gordo, dos mujeres sobresalientes en sus respectivos campos y que me han ayudado en mi camino de inexperiencia en el mundo de la investigación para poder desarrollar esta tesis.

También agradecer a mi tutor, Carmelo Loinaz, un cirujano pionero, tan excelente persona como gran profesional, que aúna la capacidad docente con un gran corazón, siempre ha sido una persona cercana y que ha sabido guiarme en los momentos en que pensaba que este trabajo no podría salir adelante.

Mención especial merece Montse Grau, gracias a tu ayuda y perseverancia logramos poder llevar a cabo nuestros estudios y en un mundo de limitaciones siempre estabas para facilitar el trabajo de los demás.

Quiero agradecer a todo el equipo de Noricum, liderado por Viviana Ramos y el gran trabajo desarrollado por Ana Civantos al frente del estudio in vitro. También agradecer a los miembros del ICV liderado por Begoña Ferrari y con el inestimable trabajo de Esther Molero a la hora de desarrollar los implantes porosos utilizados en esta tesis. Toda esta felicitación incluye a la familia miembro de MULTIMAT-Challenge, cuyos fondos y sinergias han permitido desarrollar esta tesis.

Agradecer a los miembros del CIBA, y especialmente a Eduardo Romanos, por el estudio de las muestras, así como a Mario Martínez por el análisis histopatológico de las mismas. Por último, agradecer a Licesio Rodríguez el análisis de los datos presentados en esta tesis.

Agradecer a mis padres la formación y cariño que me han dado a lo largo de toda

mi vida, nada de lo que soy hoy en día sería viable sin ellos. Agradecer a mi hermano Borja su amor y esa complicidad que solo los hermanos entendemos.

No quisiera olvidarme de mi segunda familia, el servicio de Cirugía Maxilofacial del H.U. 12 de Octubre, donde me formé como cirujano y como persona y sin cuya influencia no podría presentar esta tesis doctoral.

Por último y más importante, gracias a mi mujer Elisa y a mi hija Lucía, vuestra constancia y amor me sirven de inspiración cada día.

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Instituto de Investigación 12 de Octubre (I+12) y ha sido desarrollada en el marco de los objetivos de los siguientes proyectos:

MULTIMAT Challenge: Materiales Multifuncionales para retos de la Sociedad: S2013/MIT-2862.



*“Si he visto más lejos es porque estoy sentado
sobre los hombros de gigantes.”*

Sir Isaac Newton (1643-1727)

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	19
ABREVIATURAS	29
<i>I. INTRODUCCIÓN</i>	33
1. INGENIERÍA DE TEJIDOS ÓSEOS	35
2. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA ÓSEA	44
2.1. Estructura macroscópica del hueso	45
2.2. Estructura microscópica del hueso	48
A. Células	48
B. Matriz Orgánica.	54
C. Fase Mineral	59
2.3 Remodelación ósea	59
2.4. Reparación o consolidación ósea	61
3. TÉCNICAS DE REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO	65
3.1. Introducción	65
3.2. Injerto autólogo	68
3.3. Injerto alogénico	70
3.4. Injertos Xenógenos y Aloplásticos	71
3.5. Biomateriales	71
A. Metales	74
B. Materiales Poliméricos	84

C.	Materiales cerámicos	90
D.	Materiales biológicos. Técnicas celulares	92
4.	MATERIALES POROSOS	99
	4.1. Introducción	99
	4.2. Técnicas de producción	103
A.	Sinterización de polvos metálicos	104
B.	Espaciadores de Sacrificio	105
C.	Réplicas o exo-plantillas.	106
D.	Síntesis por autopropagación o síntesis por combustión.	107
E.	Técnicas de manufactura aditiva	108
	4.2.E.1. Estero-Litografía	117
	4.2.E.2. Sinterización Selectiva por Laser	120
	4.2.E.3. Impresión en 3D	122
	4.2.E.4. Fusión por haz de electrones y Fusión selectiva por Laser	123
	4.2.E.5. Moldeo por deposición de fundidos	125
	4.2.E.6. Moldeo Robotizado (Robocasting)	127

<i>II. JUSTIFICACIÓN</i>	129
<i>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i>	145
<i>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	151
1. PRODUCCIÓN DE IMPLANTES POR MOLDEO ROBOTIZADO (ROBOCASTING) Y CARACTERÍSTICAS	151
2. ESTUDIO IN VITRO	155
2.1. Cultivo celular	155
2.2. Determinación de la actividad metabólica	156
2.3. Determinación de la actividad ALP	157
2.4. Tinción del citoesqueleto celular	158
2.5. Contenido total de proteínas	158
2.6. Estudio Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	159
3. ESTUDIO IN VIVO	160
3.1. Diseño	160
3.2. Estudio experimental	163
3.3. Tomografía Computarizada (SPECT-TC)	166
3.4. Tratamiento Histológico	169
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	172

<i>V. RESULTADOS</i>	175
1. ESTUDIO IN VITRO	175
1.1. Determinación de la actividad metabólica (Ensayo de Alamarblue)	175
1.2. Estudio de la capacidad de diferenciación ósea en los implantes de titanio mediante determinación de la actividad fosfatasa alcalina (ALP) (Ensayo de diferenciación)	183
1.3. Estudio de la morfología celular en los implantes de titanio mediante tinción del citoesqueleto celular por inmunocitoquímica directa	185
1.4. Estudio de la proliferación celular en los implantes de titanio mediante determinación del contenido total de proteínas	186
1.5. Estudio de la morfología celular en los implantes de titanio mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	188
2. RESULTADOS IN VIVO	192
2.1. Evaluación formación ósea con nano SPECT-CT	193
2.2. Evaluación formación ósea en Histología	197
<i>VI. DISCUSIÓN</i>	201
<i>VII. CONCLUSIONES</i>	227
<i>VIII. BIBLIOGRAFÍA</i>	231

RESUMEN

RESUMEN

Título: Estudio de la Capacidad de Regeneración Ósea de implantes microporosos de Titanio procesados mediante Robocasting.

Introducción: La regeneración ósea es un concepto aplicado a un amplio abanico de campos en la medicina teniendo como principal objetivo lograr la regeneración del hueso o bien el aumento del mismo. Se han sido descritos múltiples técnicas, siendo evidentes en varios estudios las considerables limitaciones y complicaciones que existen con los tratamientos clínicos actuales.

El desarrollo de este campo con la evolución de los diferentes materiales estudiados ha sido continuo en los últimos años. Inicialmente, los polímeros y cerámicas demostraron pobres tasas de resistencia frente a las cargas fisiológicas a las que son sometidas habitualmente los huesos. Como alternativa, las estructuras metálicas suponen un atractivo debido a su resistencia mecánica y a su comportamiento frente a la fatiga en largos periodos de tiempo.

El titanio es hoy en día el material de elección para múltiples procesos ortopédicos, así como para la rehabilitación implantológica dental debido a la combinación de sus excelentes propiedades mecánicas y a su biocompatibilidad. Recientemente, basándose en los implantes compactos de titanio, se han comenzado a desarrollar componentes porosos de titanio.

Actualmente se están fabricando estructuras metálicas tridimensionales complejas usando distintas técnicas aditivas. El Robocasting es una técnica aditiva en la cual una pasta de tinta se hace pasar a través de una boquilla móvil dando forma al objeto capa a capa. En esta técnica un modelo con diseño asistido por computadora 3D es dividido en capas, un fluido es extruido a través de una pequeña boquilla, dando la forma del modelo previo.

Síntesis: El Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV), perteneciente al CSIC, junto con el grupo de tecnología de polvos de la UC3M (GTP-UC3M) desarrollaron unos

dispositivos microporosos de titanio mediante técnica de robocasting, incluidas dentro del programa MULTIMAT-CHALLENGE, que son los implantes que utilizaremos en esta tesis.

El objetivo de la tesis es demostrar la utilidad de estos implantes como alternativa a los implantes clásicos para la reconstrucción de defectos óseos. Para ello inicialmente se diseñó un estudio *in vitro* para valorar las características de adhesión celular y proliferación sobre las superficies de los implantes. Se estudiaron tres tipos diferentes de implantes microporosos en función del diámetro del filamento de tinta utilizado en el proceso de robocasting (PA-400, PA-600 y PR-800).

Se realizó un cultivo celular con dos tipos de cepas celulares. Células C2C12-GFP, la cual es una línea celular adherente premioblástica de músculo de ratón, que se diferencian hacia linaje osteoblástico, y células MC3T3-E1, la cual es una línea celular adherente preosteoblásticas de ratón. Son células procedentes del hueso craneal de ratón y ya de por sí expresan marcadores propios de linaje óseo como la fosfatasa alcalina (ALP, alkaline phosphatase de sus siglas en inglés). En ambos casos se realizó un estudio control sin proteína rhBMP-2 y otra muestra activada con rhBMP-2.

En los cultivos de C2C12 se observó adhesión y proliferación del cultivo a 4 días en los tres tipos de muestras. Además, destaca una mayor densidad celular en la muestra PA600. En los cultivos de preosteoblastos MC3T3-E1 se evaluó, aunque de forma indirecta, la proliferación celular a 4 y 7 días post siembra. Las muestras permitieron la adherencia y proliferación de los preosteoblastos tanto a 4 como a 7 días, pudiéndose confirmar mediante esta técnica, el incremento de la actividad metabólica asociado a un aumento de la densidad celular presente en las muestras.

Aunque no existen diferencias significativas en el ensayo a tiempos largos (7 días), este hecho demuestra que las superficies de titanio son totalmente biocompatibles con una línea celular específica de hueso, ya que se alcanzan valores de actividad metabólica similares entre las tres muestras y con el control, y que dicha actividad aumenta al aumentar el tiempo de ensayo. No obstante, no existieron diferencias estadísticamente significativas en las muestras activadas con BMP-2 frente a las no

activadas, lo cual junto a los bajos valores de fosfatasa alcalina nos hacen concluir que el recubrimiento con la proteína se despegó por lo que no fue efectivo.

Al no observar diferencias estadísticamente significativas se decidió realizar un estudio in vivo incluyendo los tres tipos de implantes sin la adición en este caso de BMP-2 ante el despegamiento que existió en el estudio previo. Se diseñó un estudio experimental in vivo basándonos en la literatura facilitada. Se conformaron tres grupos de conejos neozelandeses (n=9), uno por tipo de implante desarrollado.

En un primer tiempo se realizó la inserción del implante poroso de titanio en la calota del conejo bajo anestesia general. Se realizó un defecto crítico parietal a un lado de la línea media depositando una esponja de titanio.

A las seis semanas se procedió a la misma técnica descrita anteriormente para la deposición de un segundo implante de la misma porosidad del previo, retirándose los implantes en bloque con el hueso parietal a las doce semanas de la primera cirugía.

Las muestras fueron estudiadas radiológicamente a través de nanoSPECT-CT, valorando el crecimiento óseo y la densidad del mismo. Posteriormente fueron procesadas para su estudio anatomopatológico valorando crecimiento y actividad metabólica.

Las imágenes del nanoSPECT-CT demostraron la completa fusión del implante poroso con el hueso colindante desde las primeras 6 semanas. Los hallazgos anatomopatológicos mostraron que diferentes tejidos y células, incluyendo tejido conectivo y tejido óseo, pueden crecer fácilmente a través del entramado tridimensional del implante poroso, sugiriendo una buena biocompatibilidad, la cual es beneficiosa para el crecimiento de tejido óseo y favorece la regeneración del cráneo de los conejos.

Conclusiones: Los implantes microporosos de titanio estudiados en esta tesis han demostrado ser unos implantes validos para permitir el crecimiento óseo y vascular en su interior, siendo una posible alternativa a los implantes macizos clásicos.

Su estructura porosa permite una correcta adhesión y proliferación ósea en su interior, favoreciendo su integración a nivel del defecto, pudiendo ser una futura alternativa en la reconstrucción de defectos en el área maxilofacial, aunque para ello haría falta un estudio a largo plazo donde los implantes fueran sometidos a cargas soportadas. Se necesitan más estudios para demostrar la implementación segura de estos tipos de implantes en seres humanos.

SUMMARY

Title: Study of Bone Regeneration Capacity of Titanium Microporous Implants Processed by Robocasting.

Introduction: Bone regeneration is a concept applied to a wide range of fields in medicine with the main objective of achieving or increasing bone regeneration. Multiple techniques have been described due to the significant limitations and complications that exist with current clinical treatments.

The development of this field has been continuous in recent years together with the development of different type of materials. Polymers and ceramics showed a poor rate of resistance to the physiological loads to which the bones are routinely subjected. Alternatively, metal structures are attractive due to their mechanical strength and the ability to resist fatigue over long periods of time.

Nowadays, titanium is the material of choice for multiple orthopedic processes due to its excellent mechanical properties and its high biocompatibility. Recently, based on compact titanium implants, titanium porous metals have begun to be developed.

Complex three-dimensional metal structures are currently being manufactured using different additive techniques. Robocasting is an additive technique in which a filament of ink through a nozzle forms the object layer by layer. In this technique a model with 3D computer-aided design is divided into layers, a fluid is extruded through a small nozzle, giving the shape of the previous model.

Synthesis: The Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV) with the powders technology group of UC3M (GTP-UC3M) developed a microporous titanium device using robocasting technique. These implants were created under the MULTIMAT program and used in the present thesis.

The main goal of the thesis is to demonstrate the usefulness of these implants as an alternative to classic implants for the reconstruction of bone defects. For this reason, an

in vitro study was initially designed to assess the characteristics of cellular adhesion and proliferation on implant surfaces. Three different types of microporous implants were studied depending on the diameter of the ink filament used in the robocasting process and space between them (PA-400, PA-600 and PR-800).

A cell culture was performed with two types of cellular lines. On one hand, we used the C2C12-GFP cells, which are a preosteoblastic mouse muscle adherent cell line. C2C12 cells differentiated towards an osteoblastic lineage. On the other hand, we used the MC3T3-E1 cells, which are a mouse preosteoblastic adherent cell line isolated from the skull bone of mice that already express typical markers of bone lineage, such as, alkaline phosphatase (ALP). In both cases, a control study without rhBMP-2 protein and another sample with activated rhBMP-2 was performed.

C2C12 cells were able to adhere and proliferate at four days in the three types of implants. In addition, a higher cell density was observed in the PA600 sample.

In preosteoblast MC3T3-E1 cultures, the cell proliferation was indirectly (at 4- and 7-days post seeding) calculated. The three type of samples allowed the adhesion and proliferation of the preosteoblasts, at 4 and 7 days after the seeding. An increase in the metabolic activity was associated with an increase in the cell density in all the samples.

Although there are no significant differences in long-time tests (7 days), the results show that titanium surfaces are fully biocompatible with a specific bone cell line, as similar values of metabolic activity were observed between the three samples and the control, and this activity increases with time. However, there were no statistically significant differences in the samples activated with BMP-2 versus those that were not activated. In addition, the low alkaline phosphatase values lead us to conclude that the protein coating was detached.

In the absence of statistically significant differences in the *in vitro* study, we decided to perform an *in vivo* study using the three types of implants but without the addition of BMP-2. It was designed an experimental *in vivo* study with three groups of New Zealand rabbits (n = 9), one per type of implant developed.

Two porous titanium implants were inserted in the calota of the rabbits under general anesthesia. A critical parietal defect was done, and the first sponge was deposited in the defect.

Six weeks later, another critical bone defect was carried out for the deposition of the second implant with the same porosity. Both implants were removed together with the parietal bone after twelve weeks of the first surgery.

The samples were studied radiologically using the nanoSPECT-CT, where bone growth and bone density were assessed. Additionally, the samples were processed for their histological analysis, in order to evaluate bone growth and metabolic activity.

Images of nanoSPECT-CT demonstrated complete fusion of the porous implant with the adjoining bone from the first six weeks. Histological findings showed that different tissues and cells, including connective tissue and bone tissue, can easily grow through the porous three-dimensional implants, suggesting a good biocompatibility, which is beneficial for the growth of bone tissue and favors the regeneration of the skull of rabbits.

Conclusions: Porous titanium implants are a novel alternative to classic solid implants, sharing similar mechanical characteristics and great biocompatibility. Its porous structure allows a correct adhesion and bone proliferation inside, favoring its integration at the level of the defect. Porous titanium implants are a future alternative in the reconstruction of defects in the maxillofacial area.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

3DP: Three Dimensions Printing (Impresión en 3D).

Abs: Absorbancia

ADSCs: Adipose Stem Cells (células madre derivadas del tejido adiposo)

AISI (316L): American Iron and Steel Institute (acero inoxidable grado 316L)

ALP: Alkaline Phosphatase (Fosfatasa alcalina)

AM: Additive Manufacturing

BMAC: Bone Marrow Concentrate (Concentrado de médula ósea)

BMP: Bone Morphogenetic Protein (Proteína morfogenética ósea)

BMU: Bone Multicellular Unit (Unidades Multicelulares Básicas)

BSU: Bone Structural Unit (Unidad Estructura Ósea)

CAD: Computer Asisted Design (Diseño Asistido por ordenador)

CIBA: Centro de Investigación Biomédica de Aragón

CMC: Carboximetilcelulosa

DDM: Digital Development Management (Manufactura Digital)

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

EBM: Electron Beam Melting

ECM: Matriz Extracelular

EICH: Enfermedad injerto contra huésped

EPCs: Células progenitoras endoteliales

FDA: Food and Drug Administration

FDM: Fused Deposited Molding (Moldeo por deposición de fundidos)

GFP: Green Fluorescent Protein

GTP-UC3M: Grupo Tecnología de Polvos de la Universidad Carlos III de Madrid

HA: Hidroxiapatita

HIP: Compactación isostática en caliente

HSC: Células madre hematopoyéticas

IACS: Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud

ICV: Instituto de Cerámica y Vidrio

IGF: Factor de crecimiento similar a Insulina

Ihn: Indiah Hedgehog

iPSCs: Células madre pluripotentes inducidas

MSC: Mesenquimal stem cells
OCN: Osteocalcina
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCL: Policoprolactona
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDLA: Poliácido-D-láctico
PE: Polietileno
PFA: Paraformaldehido
PGA: Ácido Poliglicólico
PLA: Ácido Poliláctico
PLGA: Copolímeros de ácido láctico y glicólico
PLLA: Poliácido-L-láctico
PMMA: Polimetilmetacrilato
PPF: Polipropileno Fumarato
PR: Prototipado Rápido
PRP: Plasma Rico en Plaquetas
PTFE: Politetrafluoretileno
PTH: Hormona Paratiroidea
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
ROI: Region of Interest
SEM: Microscopía Electrónica de Barrido
SFF: Solid Freeform Fabrication
Shh: Sonic Hedgehog
SLA: Estereolitografía
SLM o LMD: Selective Laser Melting (fusión selectiva por láser)
SLS: Selective Laser Sintering (sinterización selectiva por láser)
STL: Stereolithography File Format
TC: Tomografía Computarizada
TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta
VHE: Volumen de Hueso Externo
VTH: Volumen Total de Hueso

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. INGENIERÍA DE TEJIDOS ÓSEOS

La ingeniería de tejidos óseos se define como un concepto aplicado a un amplio abanico de campos, teniendo como objetivo mayor lograr la regeneración del hueso perdido o bien el aumento en cantidad del mismo (Amini, Laurencin, & Nukavarapu, 2012).

La ingeniería de tejidos óseos es una especialidad conformada por un grupo muy variado de especialistas en distintos ámbitos. Ciencias tan variadas como son la biología molecular, bioquímica, ingeniería, el estudio de materiales o la medicina regenerativa integran los últimos avances en sus campos para mejorar los resultados en la ingeniería de tejidos óseos (Langer & Vacanti, 1993; Vacanti y cols., 2014). En la tabla 1 podemos apreciar un resumen de las diferentes especialidades que participan en la ingeniería de tejidos óseos.

La ingeniería de tejidos óseos nace de una necesidad de la sociedad a la que la ciencia tiene que dar solución. El aumento de la edad media de la población unido a un incremento en las demandas funcionales, guiadas por un nuevo enfoque que busca mejorar la calidad de vida, hace que la reparación y aumento de tejido óseo no solo sea una demanda de los pacientes, sino también una obligación para los especialistas.

Existen múltiples causas para la pérdida de hueso en una región, desde la mala consolidación de una fractura, a la presencia de defectos craneofaciales (Mithal y cols., 2009; Orthoworld y cols., 2011). Otras causas frecuentes son: las resecciones óseas, los traumatismos, las enfermedades degenerativas o las reconstrucciones dentales. Las principales localizaciones sobre las que se ha desarrollado la ingeniería de tejidos óseos, al ser los lugares más frecuentes donde se dan estas causas, han sido a nivel craneofacial, en los huesos largos y en la columna vertebral.

Ya desde la antigüedad múltiples civilizaciones han tratado de encontrar solución a estos problemas. Diversos materiales naturales como marfil o moluscos han sido hallados en cadáveres, principalmente en las restauraciones dentales. Si buscamos una fecha de inicio para la era de los biomateriales, debemos fecharla a finales del siglo XIX, cuando los grandes avances que se producen en la cirugía hacen que deje de ser una actividad de bajo perfil, para encumbrarla como una ciencia de primer orden. Con la introducción de las técnicas quirúrgicas asépticas y el descubrimiento de los antibióticos aumenta exponencialmente el éxito de las cirugías, disminuyendo drásticamente tanto la morbilidad como la mortalidad asociada a las mismas.

Tabla 1: Lista de campos y subcampos que incluyen la ingeniería de tejidos.

	Biofísica y biomecánica <ul style="list-style-type: none"> • Transporte celular y molecular. • Dinámica micro- y macrocirculatoria. • Mecánica celular y de tejidos.
	Biomateriales <ul style="list-style-type: none"> • Polímeros • Cerámicas • Interacción célula-biomaterial • Técnicas de microfabricación • Técnicas de fabricación 3D • Química de superficies
	Ingeniería Biomédica <ul style="list-style-type: none"> • Biorreactores • Membranas y filtración • Ingeniería de articulaciones musculo-esqueléticas • Sensores biomédicos • Procesado, autoajuste y control de señales biomédicas • Ingeniería de diseño y análisis de sistemas • Biosensores y bioelectrónica
	Biología celular y del desarrollo <ul style="list-style-type: none"> • Diferenciación celular, morfogénesis y formación de tejidos. • Interacción de célula-célula y célula-matriz. • Factores de crecimiento. • Aislamiento y selección de tipos celulares. • Cultivo celular • Angiogénesis • Células madre
	Medicina y veterinaria <ul style="list-style-type: none"> • Anatomía • Citología • Fisiología y fisiopatología
	Transplantología <ul style="list-style-type: none"> • Inmunología aplicada (inmunosupresión, inmunomodulación e inmuoaislamiento) • Preservación de órganos

A lo largo del siglo XX los grandes avances en biomateriales van a tener lugar en el campo de la cirugía protésica, introduciendo múltiples metales que permiten el remplazo completo de articulaciones con prótesis metálicas. Tras las guerras mundiales, la cirugía reconstructiva sufre un avance fundamental en nuestros días, ante el gran número de secuelas y problemas asociados que conllevaron ambas guerras (Figura 1). Los primeros materiales aloplásticos son utilizados como prótesis, dando lugar a la aparición de múltiples polímeros (Nylon, Silicona, Metacrilato...).



Figura 1: Desarrollo de prótesis para defectos faciales en pacientes mutilados en la guerra. Imágenes obtenidas del libro “La otra cara de la guerra civil”.

A pesar de los avances previos, los grandes hitos en los biomateriales llegan en la segunda mitad del siglo XX.

El primero es el remplazo total de cadera con prótesis cementada desarrollada por Charnley (Figura 2). Previamente había habido grandes avances en prótesis de cadera metálicas, pero son las primeras prótesis que demuestran eficacia a largo plazo. El gran auge que experimenta el remplazo total de cadera tiene lugar en la década de los 60 con los trabajos de Sir John Charnley (Charnley, 1961). En estos trabajos se comienza a tener en cuenta de cara a la rehabilitación los coeficientes de fricción de los materiales y el diseño y biomecánica de las prótesis, mejorando exponencialmente los resultados a largo plazo.

Otro avance fundamental por parte de Charnley fue la introducción del polimetilmetacrilato (PMMA) como cemento acrílico fraguado al frío para la fijación de la prótesis al hueso, así como la introducción de materiales plásticos en el lado

acetabular para evitar la fricción entre el metal y el hueso como por ejemplo el polietileno (Charnley, 1972).



Figura 2: Prótesis cementada desarrollada por Charnley. Imagen obtenida de www.sendagrup.com.

Posteriormente el siguiente hito remarcable en el campo de los biomateriales es el desarrollo del corazón artificial.

El 4 de abril de 1969 se llevó a cabo el primer trasplante de un corazón artificial. El corazón artificial fue desarrollado en el laboratorio del Dr. DeBakey en Baylor (Texas, EE. UU.). El dispositivo estaba hecho de fibra de plástico y dacrón (un tipo de poliéster artificial), pesaba 227 gramos y estaba unido por varios tubos de plástico a una consola de control en la cabecera de la cama del paciente (Figura 3). Fue ideado por el Dr. Domingo Liotta, y recibió el nombre de Corazón Artificial Liotta-Cooley, en honor a su inventor y al cirujano que lo implantó, el Dr. Denton Cooley.

Este hito abrió el camino al uso de bombas intracardiacas y posteriormente bombas extracorpóreas y el consiguiente estudio de biomateriales como prótesis valvulares, catéteres vasculares y prótesis vasculares (Messmer, Hallman, Liotta, Martin, & Cooley, 1970).



Figura 3: Corazón artificial desarrollado por Liotta-Cooley.

Imagen obtenida de www.clinic-cloud.com

Y finalmente se encuentra el concepto de osteointegración desarrollado por Branemark, base de la implantología dental. En los años 60, el Dr. Branemark y sus colaboradores revolucionan la rehabilitación dental con el hallazgo de la osteointegración. Su descubrimiento se trata de un hallazgo casual, estudiando la microcirculación del hueso y los problemas cicatrizales utilizaron la microscopia vital introduciendo una cámara en la tibia de varios conejos para poder observar los cambios que se producían durante la reparación del hueso. Al realizar esta técnica con una cámara de Titanio observaron que el hueso se había adherido al metal siendo imposible su retirada (Branemark y cols., 1969). En la figura 4 se observa una representación de la estructura de un implanta dental básico.

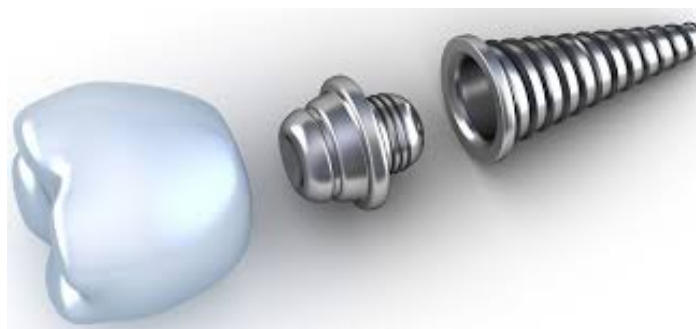


Figura 4: Imagen de un implante dental básico. Imagen obtenida www.sociedadsei.com

Pero a pesar de los grandes avances y de las múltiples técnicas descritas en la literatura, siguen existiendo hoy en día considerables limitaciones y complicaciones con los tratamientos clínicos actuales. Los problemas óseos de la población son muy diversos y en la mayoría de los casos los pacientes precisan soluciones adaptadas a la persona, siendo difícil que una sola manera de afrontar el problema de solución a todo tipo de defectos.

La ingeniería de tejidos óseos está basada en la correcta comprensión de las estructuras óseas, la función mecánica del hueso y la fisiología de la osteogénesis. En conclusión, para regenerar y reparar satisfactoriamente el hueso, el conocimiento de su biología y su desarrollo es esencial.

El paradigma clásico de la ingeniería de tejidos óseos incluye las siguientes claves (Branemark, Breine, Hallen, Hanson, & Lindstrom, 1970):

- Utilización de un material biocompatible, capaz de reproducir la naturaleza porosa del hueso.
- Poseer la capacidad de permitir a las células osteogénicas adherirse a la matriz.
- Presencia de señales morfogenéticas que diferencien las células progenitoras a células óseas.
- Presencia de suficiente vascularización para permitir el aporte de los nutrientes necesarios para el crecimiento tisular.

Los avances en esta área son continuos y el número de publicaciones en la literatura en este campo ha crecido exponencialmente en las últimas décadas (Mithal y cols., 2009; Orthoworld y cols., 2011). En la figura 5 podemos apreciar el número de artículos publicados en PubMed en los últimos años.

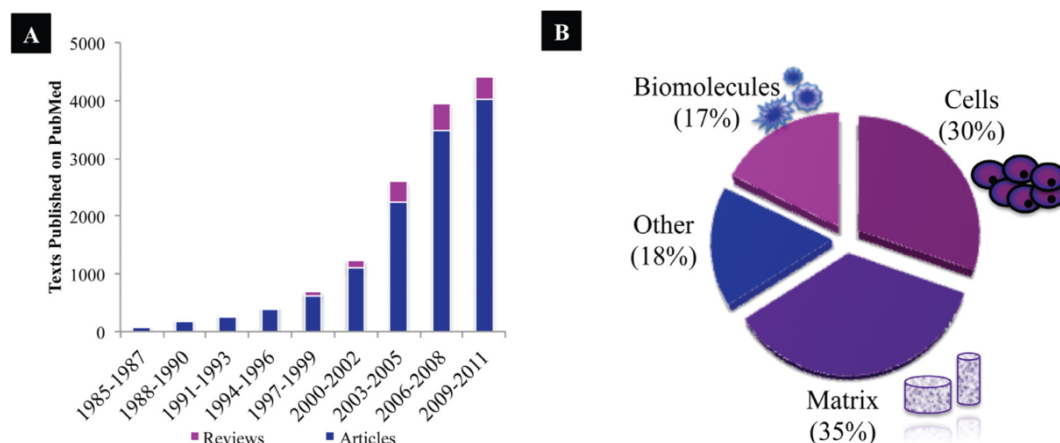


Figura 5: (A) Tabla con el número de artículos publicados sobre ingeniería ósea tisular desde mediados de los años 80 en PubMed. (B) Gráfico de los artículos publicados en 2011 acerca de la ingeniería de tejidos óseos (Amini y cols., 2012).

Tal es el volumen de literatura que los parámetros seguidos para la búsqueda bibliográfica que se utilizaron para esta tesis mostraron que tras tres años de la búsqueda inicial se habían publicado 398 artículos nuevos en este periodo que contenían los criterios de la búsqueda estandarizada.

El desarrollo de este campo y el progreso en el diseño de nuevos materiales ha sido continuo en los últimos años. Inicialmente los polímeros y cerámicas fueron los primeros materiales en los que se centraron los estudios, aunque su funcionalidad se vio puesta en duda ya que presentaban una pobre tasa de resistencia frente a las cargas fisiológicas a las que son sometidas habitualmente los huesos, llevando a que la FDA (Food and Drug Administration) advirtiera de la facilidad con la que pueden romperse estos dispositivos cuando son sometidos a cargas.

Como alternativa, las estructuras metálicas suponen un atractivo debido a su resistencia mecánica y a la capacidad de resistencia que presentan frente a la fatiga en periodos largos de tiempo.

El titanio y sus diferentes aleaciones son hoy en día el material de elección para múltiples procesos ortopédicos, así como para la rehabilitación implantológica dental

debido a la combinación de sus excelentes propiedades mecánicas y a su alta biocompatibilidad. El mecanismo bioquímico por el que el titanio posee sus propiedades osteoconductoras no está totalmente aclarado, a pesar de su utilización a nivel mundial en múltiples campos biomédicos (Kuboki y cols., 2014).

Desde un punto de vista mecánico, todo implante debe ser lo suficientemente rígido para poder soportar las cargas fisiológicas a las que va a ser sometido, pero no debe exceder drásticamente la rigidez del hueso al que sustituye para evitar la resorción ósea perimplantaria.

Uno de los problemas asociados a los implantes de titanio, tanto a nivel de la cadera como a nivel dental, es la diferencia existente entre el módulo elástico del titanio y el del hueso medular. Esta diferencia entre ambas superficies según la ley de Wolff conlleva una remodelación ósea que puede implicar una pérdida de hueso con la consiguiente pérdida del implante (Hrabe, Heintz, Bordin, Körner, & Fernandes, 2013). La ley de Wolff desarrolla que la forma y estructura de los huesos en crecimiento y de los adultos, depende del estrés y la tensión a los que están sometidos. Esto conlleva que, alterando las líneas de tensión, la forma de los huesos puede ser cambiada.

A pesar de existir estudios recientes que no encuentran evidencia para aceptar esta hipótesis (Bobyk y cols., 1992; Pilliar, Cameron, Binnington, Szivek, & Macnab, 1979; Sychterz, Topoleski, Sacco, & Engh, 2001), continúa siendo frecuente el observar como aquellos implantes sometidos a cargas presentan una mayor reabsorción ósea, que aquellos que se encuentran localizados en regiones anatómicas que no sufren cargas mecánicas.

Actualmente existe un gran avance en el desarrollo de una nueva vía dentro de los materiales metálicos. Basándose en los implantes compactos de titanio se han comenzado a desarrollar implantes porosos de titanio. La base en la que se sustenta esta nueva vía es el conseguir la correcta regeneración ósea, pero tratando de disminuir las tasas de reabsorción ósea secundarias a las cargas soportadas por estos materiales, favoreciendo el crecimiento del hueso en el interior de su estructura.

A pesar de que su potencial ha sido reconocido durante años, el desarrollo de estructuras porosas abiertas se ha visto limitado por la complejidad en su producción. Es

complejo producir una estructura porosa con el diseño adecuado que combine los requerimientos osteoconductivos y mecánicos que se precisan para soportar las cargas fisiológicas a las que son sometidos los huesos. Por ello en esta tesis se ha recurrido al desarrollo de una estructura porosa de titanio mediante una técnica que permite la adaptabilidad necesaria para los distintos tipos de defectos óseos, así como una mayor accesibilidad a la misma frente a otras técnicas similares.

2. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA ÓSEA

Los huesos son órganos constituidos de tejido conjuntivo mineralizado bien vascularizado e inervado. La estructura básica que constituye el hueso son las osteonas, y se componen de: células especializadas, matriz orgánica y fase mineral. El hueso se estructura en láminas de matriz osteoide calcificada.

El hueso es un componente básico del esqueleto del ser humano y otros seres vivos, sirviendo no solo de soporte del mismo, sino también de protección de los órganos vitales frente a agresiones externas y traumatismos.

Pero el hueso no cumple únicamente una función mecánica, sino que también tiene funciones fisiológicas al participar activamente en el equilibrio metabólico de los iones Calcio y Fósforo, necesarios para la contracción muscular y otras muchas funciones. El hueso almacena ambos iones y los libera al torrente sanguíneo en función de las necesidades metabólicas.

Dentro de las cavidades situadas en ciertos huesos (principalmente huesos medulares) se encuentra la médula ósea roja, encargada de la producción de hematíes mediante hematopoyesis.

Finalmente, también tiene función de almacén de grasas a nivel de la médula amarilla donde se acumulan adipocitos, siendo una importante reserva de energía.

Existen diferentes tipos de huesos que se clasifican según su forma:

- Huesos largos: de forma cilíndrica y alargada, presentan una parte central o cuerpo y dos extremos proximal y distal, como por ejemplo el fémur y el húmero.
- Huesos cortos: presentan forma cuboide, como son los huesos de los dedos, tarsos y rótula.
- Huesos planos: como la escápula.
- Huesos irregulares: como las vértebras o las falanges distales.

En la figura 6 se muestra una clasificación de los distintos tipos de hueso en función de su morfología.



Figura 6: Clasificación de los distintos tipos de hueso según su morfología. Imagen obtenida de www.pictoeduca.com.

2.1. Estructura macroscópica del tejido óseo

Macroscópicamente, el tejido óseo en el adulto se organiza bajo dos formas arquitectónicas, distinguiéndose dos tipos de tejido, el tejido óseo esponjoso y el compacto. La diferencia entre ambos radica en la disposición de las láminas de osteoide.

El hueso esponjoso o trabecular lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades areolares en cuyo interior se encuentra la médula ósea. El hueso cortical o compacto se estructura en conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos. En la figura 7 podemos observar las diferencias a microscopía óptica de los dos tipos de organización arquitectónica del hueso. En la imagen superior ampliada se observan los grandes espacios

denominados cavidades vasculares, ocupados por vasos sanguíneos y elementos hematopoyéticos. Estas cavidades están delimitadas por trabéculas óseas en las cuales las fibras de colágeno pueden estar dispuestas de manera entrecruzada (hueso trabecular no laminar) o bien ordenadas en laminillas óseas (hueso trabecular laminar). En la imagen inferior se observa la disposición del hueso cortical, el cual no posee cavidades vasculares, sino que su matriz extracelular se ordena en laminillas óseas, las cuales se pueden disponer de manera paralela (hueso compacto laminar) o de manera concéntrica alrededor de un canal (hueso compacto de tipo osteónico). Por este canal, denominado canal de Havers, discurren vasos sanguíneos y nervios, y junto con las laminillas óseas concéntricas y los osteocitos, dispuestos entre las laminillas, forman un conjunto denominado osteona o sistema de Havers.

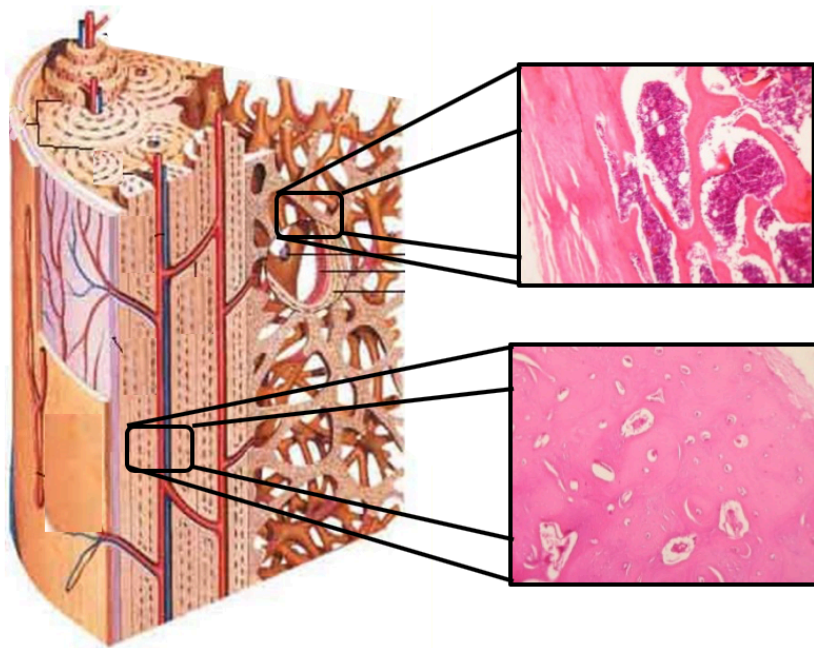


Figura 7: imagen a microscopía óptica de la distribución arquitectónica del hueso. En la imagen superior se objetiva el hueso esponjoso con las cavidades vasculares delimitadas por trabéculas óseas. En la imagen inferior se observa la disposición del hueso cortical, el cual no posee cavidades vasculares.

El tejido esponjoso, constituye el 20% del tejido óseo total. Presenta una estructura esponjosa con porosidad elevada (variable entre un 50 y el 90%) y se caracteriza por la presencia de trabéculas óseas que se localizan en la epífisis de los huesos largos y en el interior de los huesos cortos y planos. En el interior de las trabéculas se encuentran los osteocitos y entre las mismas trabéculas se localiza la médula ósea encargada de la hematopoyesis.

En cambio, el tejido óseo compacto o cortical, supone cerca del 80% del total de hueso y se localiza en la diáfisis (zona central y alargada de los huesos largos) (Sikavitsas, Temenoff, & Mikos, 2001). Este tejido es sólido (con una porosidad inferior al 10%) y se encuentra constituido por una masa compacta y continua cuya matriz mineralizada se dispone en laminillas. Entre las laminillas se sitúan los osteocitos, formando la estructura denominada Sistema de Havers u Osteona. Dicho sistema se compone fundamentalmente del canal de Havers, que contiene el vaso sanguíneo, la arteria y el nervio, que pasa por el agujero nutricio del hueso. Los canalículos calcóforos, comunican los osteocitos entre sí y permiten la entrada de nutrientes y la eliminación de desechos de los mismos (Baron y cols., 2003). El tejido óseo esponjoso se encarga de las demandas metabólicas y el tejido óseo cortical del soporte y la integridad mecánica.

Cada osteona se encuentra limitada por una línea de cemento, que es una fina capa de matriz ósea sin vascularización y pobre en fibras de colágeno. Las osteonas a su vez se comunican entre sí mediante los Conductos de Volkmann, que recorren el hueso de forma transversal, atravesando unas laminillas óseas y comunicando entre sí los conductos de Havers.

El periostio es la envoltura conectiva que rodea al hueso y está formada a su vez por dos capas, una fibrosa compuesta por fibras de colágeno y fibroblastos, y otra capa osteógena, la cual contiene los osteoblastos.

Se conocen dos tipos de osificaciones, la intramembranosa donde el tejido conectivo se empieza a crear de forma directa desde el tejido conectivo primitivo del feto (mesénquima), es decir las MSC (Mesenchymal stem cells) se diferencian directamente a células osteoprogenitoras y éstas a su vez en osteoblastos. Este proceso tiene lugar preferiblemente en huesos planos y mandíbula.

Otra vía, más indirecta, transcurre mediante una osificación endocondral. En ella se forma hueso a partir de un cartílago hialino debido a la diferenciación de las MSC hacia condroblastos y éstos sintetizan ECM (Matriz Extracelular) y colágeno. Más tarde esta matriz se osifica y se forma tejido óseo maduro. Dicho proceso es más frecuente en los huesos largos (Pilitsis, Lucas, & Rengachary, 2002).

2.2. Estructura microscópica del hueso

2.2.1. Células

El tejido óseo esta conformado por múltiples células, el origen de estas células son las células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas. Desde los trabajos de Friedenstein (Friedenstein y cols., 1974) se conoce que estas células pueden dar origen a cinco tipos diferentes de células en función de las señales activadores que les llegan (Figura 8), que inician la cascada de activación de diferentes genes (fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos).

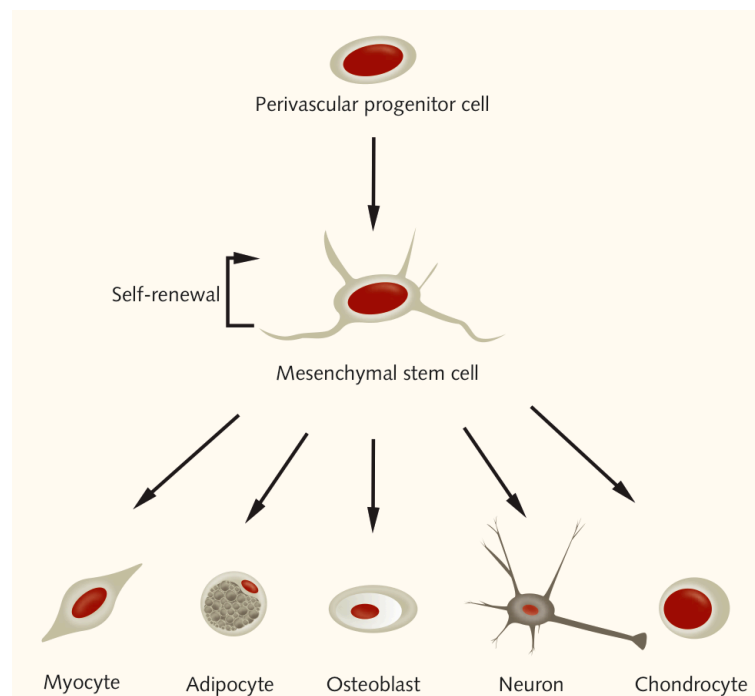


Figura 8: Líneas celulares provenientes de las MSCs. Imagen obtenida de www.labsclinics.com

Dentro de la línea de células osteogénicas, las principales que conforman el tejido óseo y que van a definir su función y actividad son las siguientes:

A. El osteoblasto

Los osteoblastos proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares, siendo las células responsables de la síntesis de la matriz orgánica o sustancia osteoide, que es la porción orgánica sin mineralizar de la matriz ósea que se forma con anterioridad a la maduración del hueso.

La diferenciación celular de las células mesenquimales a osteoblastos se conoce actualmente que está controlada por genes de la familia Hedgehog, de los cuales los más conocidos son: *Ihh* (Indian hedgehog) y *Shh* (Sonic hedgehog).

También es esencial el factor de transcripción *Cbfa 1* (core-binding factor α -1, también llamado *Runx2*) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), que constituyen los principales factores reguladores de la diferenciación de las células mesenquimales pluripotenciales en osteoblastos.

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante (Figura 9). Su vida media en los seres humanos es de una a diez semanas, pudiendo desaparecer al finalizar este periodo por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento, o en osteocitos (15%). Ambos tipos celulares representan estadios más avanzados de maduración.

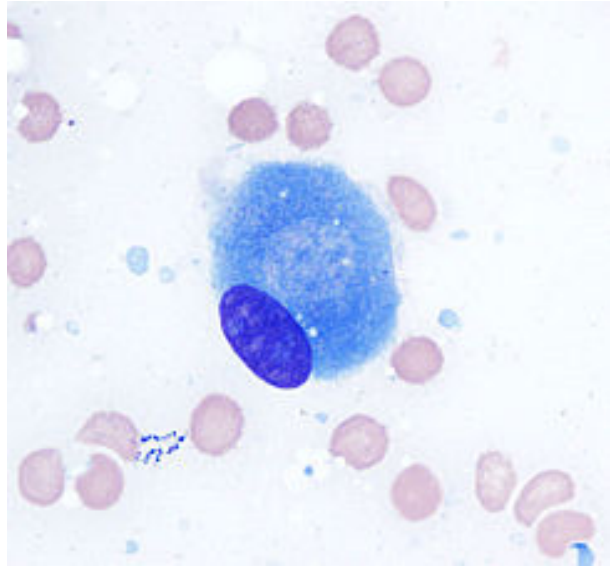


Figura 9: Imagen microscópica de un osteoblasto. Imagen obtenida de Wikipedia.

Entre las funciones del osteoblasto se encuentran:

- La síntesis de proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso.
- Controlar la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular.
- Contribución a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina (ALP).
- Mediación en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas.
- Síntesis de factores de crecimiento.

Sintetizan la matriz orgánica a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica, la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día. Los osteoblastos emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos. Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de

mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas. En estas células la conexión intercelular es la Conexina 43.

B. El osteocito

Constituyen la célula principal del hueso, al tratarse de las células más abundantes del mismo (se estima que constituyen el 95% celular).

Los osteocitos se desarrollan a través de la diferenciación de los osteoblastos, hallándose en el interior de la superficie ósea frente a los osteoblastos, osteoclastos y células limitantes que se encuentran en la superficie del hueso.

Estas células son incapaces de dividirse. El citoplasma es ligeramente alargado y basófilo, con una enorme cantidad de prolongaciones citoplasmáticas. Tienen poco desarrollado el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi, además hay pequeñas gotas de lípidos y pequeñas cantidades de glucógeno (Figura 10).

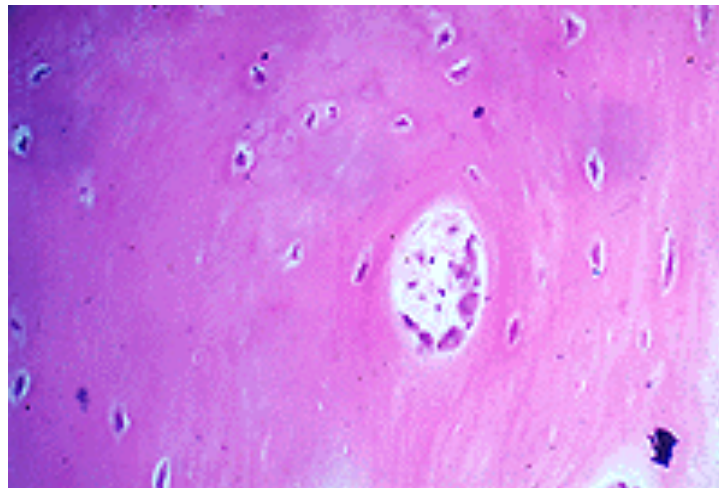


Figura 10: Imagen microscópica de osteocitos. Imagen obtenida de educa.madrid.org

Tienen la capacidad de segregar o reabsorber la matriz ósea que les circunda, de hecho se podría decir que estas células se han quedado atrapadas en su propia sustancia

de secreción. A pesar de la distancia que hay entre los osteocitos, y de la cantidad de matriz que los separa, estos permanecen en contacto a través de pequeños canales, denominados conductos de Havers, que hay a lo largo del hueso. Tiene los mismos marcadores que los osteoblastos a excepción del CD44, que es específico del osteocito.

También actúan en la formación de la matriz osteoide. La comunicación de los osteocitos es importante para controlar la cantidad de hueso que se forma y deteriora, controlando las variaciones en las cargas que soporta el hueso. Este fenómeno se conoce como mecanotransducción.

C. El osteoclasto

El osteoclasto es una célula multinucleada, móvil y gigante que degrada, reabsorbe y remodela huesos. Al igual que el osteoblasto, está implicado en la remodelación de hueso natural y deriva de células hematológicas.

Los osteoclastos, células responsables de la resorción de la matriz ósea, son células acidófilas y polinucleadas de gran tamaño (Figura 11). Ocupan una cavidad llamada laguna de resorción o laguna de Howship y se localizan en las superficies óseas firmemente asociadas a la matriz ósea, por medio de integrinas ($\alpha 5 \beta 3$). Los osteoclastos se forman por la fusión de varias células mononucleares derivadas de una célula madre sanguínea de la médula ósea, mostrando muchas propiedades de los macrófagos, formando parte del sistema monocítico macrofágico.

Los osteoclastos se caracterizan por poseer una porción de su membrana "arrugada", en forma de cepillo, rodeada de un citoplasma libre de orgánulos llamada "zona clara", con la que se adhiere a la superficie del hueso mediante integrinas.

El proceso de resorción se inicia cuando las células excretan lisosomas con enzimas capaces de producir un microambiente ácido por debajo de la membrana arrugada como consecuencia del transporte de protones mediante la bomba de protones ATP-dependiente, el intercambio Na^+/H^+ y la anhidrasa carbónica. Las enzimas lisosomales

de los osteoclastos implicadas en este proceso son cistein-proteasas como la catepsina y sobre todo, la fosfatasa ácida tartrato-resistente (esta última se utiliza como marcador del fenotipo osteoclástico). Las enzimas lisosomales solo son liberadas en la zona clara en las proximidades del borde arrugado produciéndose en esta área las reacciones de degradación de la matriz que deben producirse antes de que el medio ácido disuelva las sales minerales del hueso.

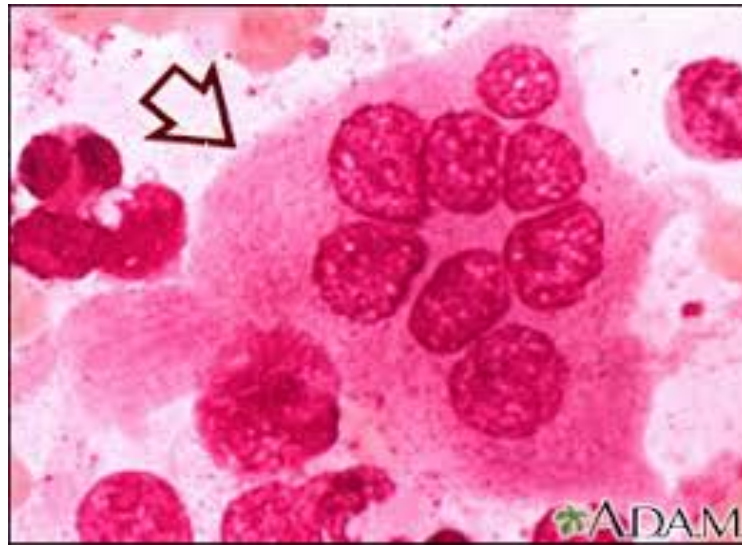


Figura 11: Imagen a microscopía óptica de un osteoclasto, imagen obtenida de www.medlineplus.gov.

La resorción osteoclástica depende de una serie de factores reguladores externos como la hormona paratiroidea, la 1,25-dihidroxiciferol (vitamina D3), la calcitonina y vitamina D. Otros factores que afectan la funcionalidad de los osteoclastos son los glucocorticoides y las prostaglandinas. Además participa en los procesos de osificación endocondral y osificación intramembranosa en las fracturas de huesos. Esto es debido a la resorción de material desechable y la intervención posterior de osteocitos en la reparación ósea.

2.2.2. Matriz Orgánica

La matriz ósea proporciona las características y propiedades específicas al hueso. Está compuesta en un 35 % por material orgánico (sobre todo fibras colágenas, proteínas óseas y proteoglicanos) y en un 65 % por minerales (sales inorgánicas), representando una tercera parte del peso del hueso.

La matriz ósea no solo es un sistema de andamiaje que permite al hueso soportar las cargas mecánicas a las que es expuesto (siendo un reservorio de calcio y fósforo), sino que también posee un alto contenido en proteínas que participan en la diferenciación ósea y en la integridad y función del tejido óseo. En la tabla 2 se resumen los principales componentes que conforman la matriz orgánica.

Tabla 2: Principales componentes que conforman la matriz orgánica del hueso (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, 2006).

COLÁGENO	<ul style="list-style-type: none">• Tipo I, III, V, XII
PROTEOGLICANOS	<ul style="list-style-type: none">• condroitin sulfato• decorina• biglicano• hialuronano
PROTEÍNAS CON ÁCIDO γ-CARBOXI-GLUTÁMICO	<ul style="list-style-type: none">• osteocalcina• proteína de la matriz con ácido γ-carboxi-glutámico
GLICOPROTEÍNAS	<ul style="list-style-type: none">• osteonectina• fosfatasa alcalina• proteínas con RGD:<ul style="list-style-type: none">- fibronectina- trombospondina- osteopontina- vitronectina- sialoproteínas óseas
PROTEÍNAS DEL PLASMA	<ul style="list-style-type: none">• ALBÚMINA• α2-SH- glicoproteína
FACTORES DE CRECIMIENTO	<ul style="list-style-type: none">• IGF-I y II (Insulin growth factor I y II)• TGF-β (Transforming growth factor -beta)• PDGF (Platelet derived growth factor)

A continuación, describiremos los diferentes componentes de la matriz orgánica:

A. Colágeno

Es el principal componente de la matriz extracelular, constituyendo más del 90% de la misma con un predominio del colágeno tipo I (>95%). El colágeno tipo V (<5%), tipo III y tipo XII también se hayan presentes. Contiene los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, siendo un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno y estando sus valores de excreción urinaria en relación directa con la tasa de reabsorción ósea.

Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas (Figura 12). Sin embargo, el colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.

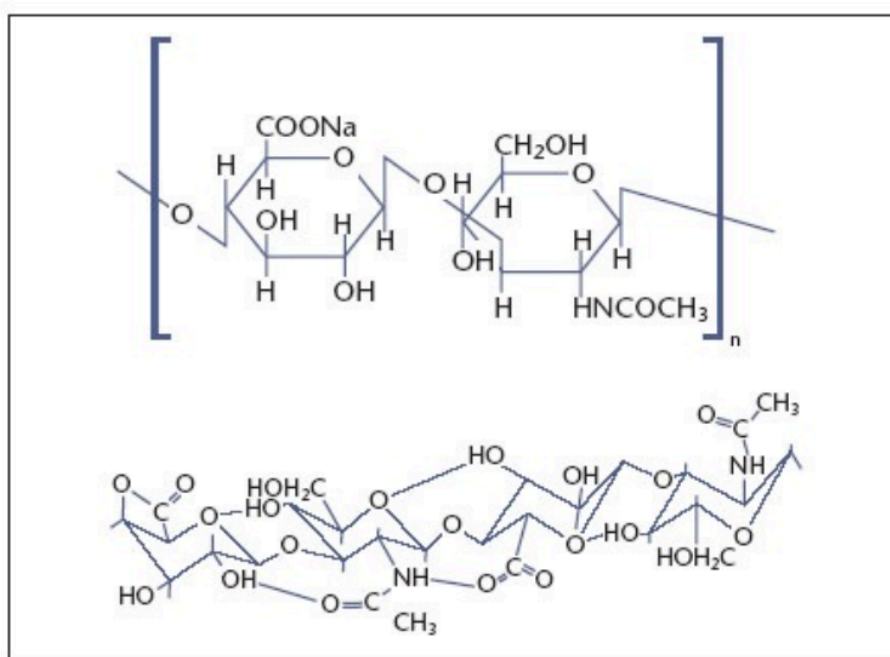


Figura 12: composición química del colágeno.

B. Proteínas no colágenas

1. Proteoglicanos

Son una clase especial de glicoproteínas altamente glicosiladas que constituyen el 10% de las proteínas no colágenas del hueso. Se encuentran unidos al aparato de Golgi, actuando como moduladores de señales en procesos de comunicación entre la célula y su entorno.

En la matriz osteoide hay cuatro tipos:

- Hialuronano.
- Condroitín-sulfato: que intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea. En la figura 13 se muestra su composición química.
- Biglicano.
- Decorina: aparecen en las fases siguientes de la formación ósea.

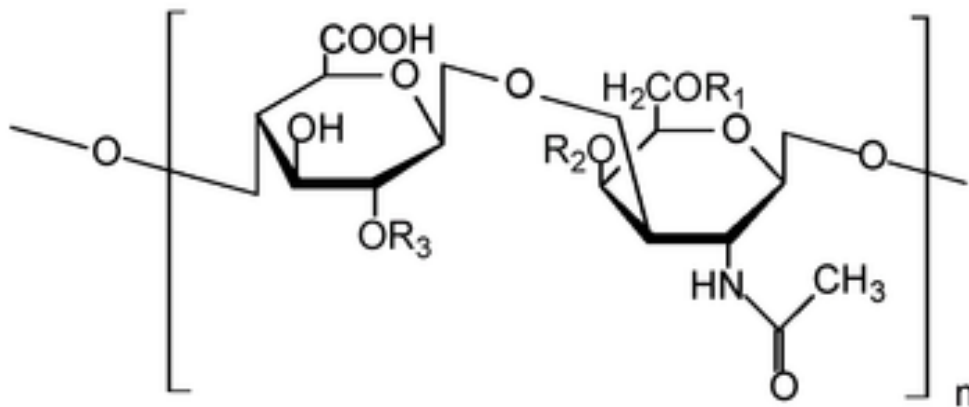


Figura 13: composición química del Condroitín-sulfato.

2. Proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico

Lo constituyen dos proteínas:

- Osteocalcina (OCN): es una hormona producida por los osteoblastos y plaquetas durante la formación ósea y que se correlaciona con el cociente de formación ósea, siendo un marcador bioquímico de osteogénesis que puede resultar útil en el diagnóstico de entidades clínicas como la enfermedad de Paget o el hiperparatiroidismo.
- La proteína de la matriz con ácido γ -carboxi-glutámico.

La síntesis de osteocalcina es regulada por las vitaminas D y K. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz ósea.

3. Glicoproteínas

Son la Osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp).

- Osteonectina: es una glicoproteína ligada del calcio que presenta gran afinidad por el colágeno tipo I y por la Hidroxiapatita. Interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células, constituyendo el 25% de las proteínas no colágenas, siendo necesario para la mineralización normal del hueso.
- Fosfatasa alcalina: es una enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos de fosfatos de varios tipos de moléculas. Libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización. La isoenzima ósea se considera un buen marcador de la actividad osteoblástica al correlacionarse directamente con la misma.

- Las proteínas con tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp): son fundamentalmente: osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Son glicoproteínas fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos. También actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales.

4. Proteínas procedentes del plasma:

Son la Albumina y la α_2 -SH-glicoproteína, relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.

- Albumina: se trata de una proteína de síntesis hepática, siendo la que se encuentra en mayor cantidad en el torrente sanguíneo. Entre sus múltiples funciones se encuentra el transporte por el torrente sanguíneo de hormonas, ácidos grasos, bilirrubina y fármacos. También tiene función en el control del pH y de la presión oncótica.

5. Factores de crecimiento:

Se tratan de polipéptidos sintetizados por el propio hueso o procedentes de otros lugares (hígado, plaquetas, etc.), que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células. Dentro de este grupo incluiremos a los siguientes:

- Factores de crecimiento similares a la insulina (IGF I y II): son unos péptidos de síntesis hepática con una estructura molecular similar a la de la insulina. Entre sus funciones tienen la de potenciar la acción de la insulina, actuar como factor de crecimiento y regulan la proliferación celular.

- Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β): conjunto de proteínas sintetizadas por múltiples células sanguíneas (macrófagos, linfocitos, plaquetas...) que están involucradas en números procesos celulares como proliferación y diferenciación celular, angiogénesis, hematopoyesis y apoptosis celular.
- Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF): regula el crecimiento y diferenciación celular, siendo fundamental en la regulación de la angiogénesis por lo que ha sido estudiado como una posible diana en patología oncológica.

2.2.3. Fase mineral:

Se denomina fase mineral del hueso (también llamado fase inorgánica de hueso, sal de hueso o apatita de hueso) al componente inorgánico del mismo.

Representa el 65% del peso del hueso. Sus principales componentes son: Calcio, fosfato y carbonato en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y, en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor.

2.3. Remodelación ósea

Se conoce al crecimiento óseo como el conjunto de procesos que tiene lugar durante el crecimiento corporal en tamaño y forma del hueso, englobando de esta manera la remodelación ósea. Se trata de un mecanismo complejo por el cual el hueso se renueva constantemente, en un proceso coordinado de formación y resorción, adaptándose a los cambios y cumpliendo su función de reservorio de calcio (Pullisaar, Reseland, Haugen, Brinchmann, & Ostrup, 2014).

En ningún momento el hueso cambia de forma, ya que la resorción y formación ósea tiene lugar en el mismo sitio, denominado unidades multicelulares básicas (BMUs del inglés *Bone Multicellular Unit*) donde pequeños grupos de células actúan de forma coordinada produciendo nuevo tejido conocido como unidad estructural ósea (BSU del inglés *Bone Structural Unit*) (Frost y cols., 1991).

El mantenimiento de la masa ósea requiere un equilibrio entre la formación de hueso por los osteoblastos y la reabsorción por los osteoclastos (Pivonka & Dunstan, 2012) . Para ello ambos procesos se encuentran regulados por distintos tipos celulares (osteoblastos y osteoclastos) y diversos factores que controlan y dirigen la acción celular como hormonas (calcitonina, la hormona paratiroidea (PTH), 1,25-dihidroxitamina D, hormonas sexuales y otras hormonas esteroideas), hidroxiapatita, moléculas de la ECM, factores locales (citoquinas, factores de crecimiento...), iones, vitaminas, efectos de la carga mecánica en el esqueleto, e incluso factores genéticos (Papachroni, Karatzas, Papavassiliou, Basdra, & Papavassiliou, 2009).

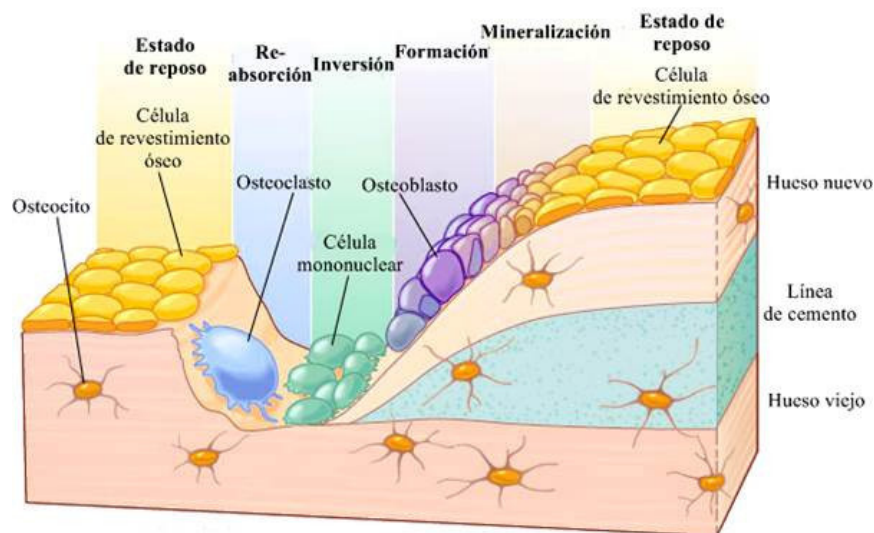


Figura 14: Proceso de remodelación ósea. Imagen obtenida de www.nutriendotusalud.com

Como se aprecia en la figura 14, el proceso de remodelación ósea se inicia en la fase de reposo con la activación de los precursores de osteoclastos, los cuales migran y se diferencian. En esta fase de resorción los osteoclastos diferenciados destruyen cierta cantidad de hueso y al finalizar entran en apoptosis. Como consecuencia de la resorción

ósea se liberan al medio iones de calcio, proteínas de matriz y factores de crecimiento que a su vez actúan como activadores de la regeneración de la misma matriz, es decir, activan la diferenciación de las células osteoprogenitoras hacia la formación de osteoblastos, encargados de sintetizar nuevo hueso y comenzando así la fase de reversión. Además, el osteoblasto produce osteoprotegerina, que inhibe la osteoclastogénesis. A continuación, tras la fase de formación, los osteoblastos maduran a osteocitos y se integran en la matriz que a su vez se mineraliza, entrando de nuevo en la fase de reposo.

2.4. Reparación o consolidación ósea

Los traumatismos son una de las principales causas de disfunción del tejido óseo. Una fractura se define como una discontinuidad del tejido óseo como consecuencia de una sobrecarga o procesos patológicos al aplicar sobre el hueso una fuerza mayor de la que éste puede soportar, tratándose de la lesión más frecuente a nivel del sistema musculoesquelético.

La consolidación ósea es el proceso de reparación que tiene como objetivo restablecer la estructura tisular y las propiedades mecánicas. Se trata de un complejo proceso biológico en el cual participan un gran número de tipos celulares, factores bioquímicos y biomecánicos, y la expresión de múltiples genes.

El proceso de consolidación ósea comienza con la estabilización de los callos endóstico y perióstico, este proceso hace que se restablezca la continuidad de la fractura. Existe una consolidación primaria, más directa, sin necesidad de formación de callo perióstico, aunque este proceso solo tiene lugar en condiciones óptimas de estabilidad (reducción anatómica y compresión interfragmentaria) en fracturas cuyos extremos estén en contacto y empleando una fijación rígida.

En el caso de consolidación secundaria o indirecta (la más frecuente), los extremos óseos no están en contacto total diferenciándose las siguientes fases (Wilkins y cols., 2005):

- Fase inflamatoria o postraumática: La fase inflamatoria se inicia en el momento en que se produce la fractura y su duración es aproximadamente de un par de semanas, dependiendo de las condiciones fisiológicas. El pH normal de la sangre y de los fluidos intersticiales oscila entre valores de 7,35- 7,45. Sin embargo durante este periodo exudativo, el pH sanguíneo disminuye, alcanzando valores de 5,2 (Xuanyong Liu, Chu, & Ding, 2004). En esta etapa tiene lugar la formación de un coágulo y la consiguiente aparición de un hematoma.

Gracias a un aumento de la vasodilatación y de la permeabilidad vascular se favorece la migración de células osteoprogenitoras procedentes del periostio y de la médula, la activación de plaquetas para la formación del coágulo y la migración de células del sistema inmune (como leucocitos granulocitos y macrófagos).

- Fase de formación de callo: Una vez establecido el coágulo, el aporte de oxígeno y los nutrientes disminuye, activándose la liberación de diferentes factores (PDGF y TFG- β) (Tsiridis, Upadhyay, & Giannoudis, 2007). Este hecho promueve la diferenciación de las MSC en células osteoprogenitoras las cuales se diferencian a su vez en osteoblastos (los cuales sintetizan la matriz ósea). Tras esta fase de reparación el pH de la zona se torna neutro debido a la desaparición del proceso inflamatorio y a la recuperación del riego sanguíneo. Desde los extremos de la fractura comienza la reabsorción del tejido necrosado por los osteoclastos lo que permite que los vasos del periostio aporten los brotes vasculares que inician la reparación y formación de un callo blando.

En este estadio se alcanzan niveles máximos de actividad fosfatasa alcalina favoreciendo el inicio de la mineralización del callo óseo (Braddock, Houston, Campbell, & Ashcroft, 2001).

Las MSC del foco de fractura y del torrente sanguíneo son las responsables de la neoformación ósea. La composición del callo óseo varía en función de la fase de regeneración ósea, las células sustituyen el coágulo de fibrina por una matriz fibrosa que contiene colágeno tipo I y III, proteoglicanos y

glicosaminoglicanos. A continuación, el tejido fibroso se transforma en fibrocartílago con alto contenido de colágeno tipo II y proteoglicanos específicos. En la fase final de la mineralización, se concentra colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y proteínas no colágenas que concluyen con la osificación del callo óseo inmaduro.

- Fase de remodelación ósea: Por último, existe una fase de remodelación donde el hueso inmaduro se transforma en hueso laminar. En esta etapa, que tiene lugar sobre las seis semanas tras la fractura, los osteoclastos reabsorben las trabéculas mal orientadas y las sustituyen por otras nuevas adaptadas a las líneas de fuerza que sigue el hueso siguiendo la ley de Wolff.



Figura 15: Etapas de la reparación de una fractura ósea. A) Formación de un hematoma seguido de un proceso inflamatorio, angiogénesis localizada y vascularización. B) y C) Formación de un callo fibrocartilaginoso que se mineraliza convirtiéndose en un callo óseo esponjoso. D) Síntesis de ECM y se finaliza con el remodelado óseo (Braddock y cols., 2001).

Por lo tanto, se distinguen tres fases fundamentales que constituyen el proceso de reparación ósea, y que se solapan en el tiempo (Figura 15). Además, hay que tener en cuenta que durante una fractura ósea se ven afectadas no solo las células del propio tejido sino también otros tejidos adyacentes como vasos sanguíneos y tejido muscular.

El proceso de consolidación ósea está regulado por distintos factores, entre los que destacan los factores mecánicos y los factores biológicos.

Los factores mecánicos son los más importantes. La distracción o cizallamiento óseo a nivel del foco de fractura supone una mala aposición de los fragmentos óseos dificultando o incluso impidiendo la correcta consolidación ósea, por lo que una carga axial controlada y terapias físicas como los ultrasonidos, han demostrado efectividad para la mejoría de la cicatrización a nivel de la fractura.

Los factores biológicos engloban a factores de crecimiento como TFG- β o BMPs, que van a favorecer la consolidación ósea, así como cualquier factor bioquímico que cumpla función anabolizante (hormona de crecimiento, insulina, hormonas tiroideas...), además de las vitaminas A y D. Pero, por otro lado, también tendremos factores biológicos que dificulten la correcta consolidación de la fractura como son: la diabetes, el tratamiento crónico con corticoides, los fármacos citostáticos, la malnutrición, la presencia de enfermedades óseas previas (osteoporosis, enfermedad de Paget...), la hipoxia local o las infecciones.

Si en la siguiente fase que corresponde al establecimiento de una unión ósea, o desde un principio, la fractura no presenta estabilidad mecánica, se puede generar una pseudoartrosis hipertrófica. Sin embargo, el proceso tolera un pequeño margen de movimiento que a su vez estimula la reparación ósea.

Por último, tienen lugar procesos de remodelación en el tejido óseo neoformado, cuya finalidad es aportar la resistencia inicial del tejido sano.

A pesar de que el hueso es capaz de repararse por si mismo, en caso de presentar defectos importantes o no presentar las condiciones fisiológicas adecuadas (p. ej. pacientes diabéticos, tejidos irradiados...), esta capacidad puede verse limitada o incluso no permitir la correcta consolidación. Estos casos se conocen como defecto crítico, a pesar de que este concepto es ampliamente utilizado en la literatura no se encuentra muy bien definido, Ochandiano y cols. (Caicoya, 2007) lo definen como un defecto que afecta como mínimo a tres paredes del defecto óseo. En los estudios en animales encontramos definiciones más desarrolladas, donde se considera defecto crítico a aquel defecto cuya regeneración es menor del 10% pasadas 12 semanas de la creación del mismo.

3. TÉCNICAS DE REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO

3.1. Introducción

La principal función del hueso es ser el soporte estructural del aparato locomotor en el ser humano, pero ya hemos comentado previamente que también posee otras funciones aparte de la de proteger los órganos vitales, como contener los elementos necesarios para la hematopoyesis y mantener la homeostasis de electrolitos claves como son el fósforo y el calcio. Además, el hueso está inmerso en un constante círculo de reabsorción y regeneración, sometiéndose a un intercambio químico y remodelado estructural debido a mediadores internos y demandas mecánicas externas.

Los objetivos que busca la regeneración ósea es que el nuevo tejido se integre con el hueso remanente y cumpla con las funciones que realizaba el hueso al que sustituye.

Las principales propiedades que presentan los sustitutivos óseos con respecto a la regeneración del hueso incluyen:

- **Osteoconducción:** entendemos por osteoconducción a la capacidad de guiar el crecimiento de reparación del hueso natural. En el caso de los biomateriales consiste en el crecimiento del hueso dañado, penetrando en la cavidad o la superficie del material inerte. Es una característica que presenta la práctica totalidad de sustitutivos óseos que sirven como andamiaje para el crecimiento del hueso.
- **Osteoinducción:** entendemos por osteoinducción cuando el material sustitutivo estimula la diferenciación de las células no diferenciadas para convertirse en osteoblastos activos. Un material osteoinductivo es capaz de inducir la transformación de células indiferenciadas en osteoblastos o condroblastos en una zona en la que normalmente no ocurre este fenómeno. Los materiales osteoinductivos contribuyen a la formación ósea durante el proceso de remodelación. Esta capacidad la encontraremos en los materiales autólogos,

como los injertos óseos del propio paciente y en menor medida en los materiales homólogos, como son los injertos liofilizados de cadáver.

- **Osteogénesis:** se trata de la capacidad del material de crear hueso y contribuir a la remodelación ósea. Es el proceso por el cual los materiales pueden formar hueso, por la presencia de células mesenquimales indiferenciadas. Es el caso de los injertos óseos, que contienen células óseas vivas (p. ej. Injerto autólogos), que inducen los factores de crecimiento del hueso remanente.

Las principales características que se buscan en un injerto óseo son:

- Alta osteoinducción y potencial angiogénico: la inducción de la diferenciación de las células mesenquimales indiferenciadas en células óseas, así como la estimulación de la vascularización, favorecerán la creación de nuevo hueso y su correcta nutrición.
- Seguridad biológica: los sustitutivos óseos deben cumplir estrictas medidas de seguridad para evitar la transmisión de enfermedades al paciente que vaya a recibir el tratamiento.
- Baja morbilidad: la obtención del material de una procedencia ajena al paciente disminuye la morbilidad de una posible zona donante.
- Ausencia en la restricción del tamaño: otra de las desventajas de obtener el tejido del propio paciente puede ser en muchas ocasiones las limitaciones en el tamaño y la cantidad de hueso disponible. Esta es una desventaja que no encontramos con la obtención del tejido de otras fuentes que no sean el propio paciente.
- Buen acceso al cirujano: la facilidad en la obtención del injerto disminuye el tiempo quirúrgico y la consecuente morbilidad que

asocia un mayor tiempo quirúrgico con mayor grado de inflamación y mayor probabilidad de infección de la herida quirúrgica.

- Larga duración: la búsqueda de injertos con la mayor duración posible en el tiempo es otro de los objetivos que debe plantearse a la hora de elegir el mejor sustituto para la regeneración del hueso.
- Coste razonable.

Tabla 3: tipos de materiales que se utilizan en la regeneración ósea guiada, principales ventajas y desventajas.

<i>Materiales</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
<i>Injerto Autólogo</i>	Económico No antigénico No transmite enfermedades Osteoinducción Osteoconducción	Limitada disponibilidad Morbilidad áreas donantes No se puede almacenar Obtención con anestesia general (ocasionalmente).
<i>Injerto Alogénico</i>	Gran disponibilidad Almacenable Osteoinductor leve Osteoconductor	Puede transmitir enfermedades Proceso de elaboración costoso Posee poder antigénico
<i>Injerto Xenógeno</i>	Elaboración industrial Osteoconductor por excelencia Nula reacción inflamatoria	Posible transmisión de enfermedades Proceso de elaboración costoso No posee osteoinducción
<i>Biomateriales</i>	No transmite enfermedades Osteoconducción Disponibilidad ilimitada Fácil manejo Alto nivel de calidad Almacenamiento sencillo	Costo elevado No posee capacidad de osteoinducción Reacción a cuerpo extraño

En la tabla 3 se exponen los diferentes tipos de injertos que se utilizan en la regeneración ósea guiada, comparando sus principales ventajas y desventajas. A continuación, se desarrollará más ampliamente estas características.

3.2. Injerto autólogo

El material que cumple con la mayoría de estas características es el injerto de hueso autólogo. Consideramos injerto autólogo aquel cuyo origen proviene de la misma persona que presenta el defecto óseo. El hueso autólogo ha sido una de las herramientas más destacadas para intentar solucionar estos defectos, siendo considerado actualmente el gold-standard para injertos óseos (Misch, Qu, & Bidez, 1999).

Representa el material reconstructivo ideal pues aporta biocompatibilidad total, tiene un elevado potencial osteogénico, una gran resistencia mecánica y a la infección y asegura una rápida consolidación. Posee las propiedades deseadas en cualquier injerto óseo: células con capacidades osteoinductivas (BMPs), células osteogénicas (células osteoprogenitoras) y células osteoconductoras (matriz ósea), por lo que en la teoría es el tipo de injerto más completo de cara a la regeneración ósea.

Entre las principales ventajas que se asocian a los tejidos autólogos frente al resto se encuentran su alta biocompatibilidad, ya que al ser tejido del propio espécimen no presenta ningún tipo de rechazo inmunológico. También es importante su adaptabilidad, ya que el hueso humano no es el mismo en función de la región que nos encontremos, por lo que es importante que elijamos correctamente la zona donante para que se adapte en función y posición a la zona del defecto.

Frente a estas ventajas, como cualquier técnica presenta inconvenientes, y es que suelen ser técnicas con morbilidad asociada a la zona donante de hueso. Generalmente, se precisa realizar una segunda intervención sobre otras regiones donde se producirá un traumatismo, con las consiguientes posibles complicaciones postoperatorias como sangrado, inflamación, infección, dolor y deformidad.

Otra de las principales desventajas asociadas a este tipo de injertos es la limitación del tejido disponible. Los pacientes disponen de una cantidad de tejido, que incluso en caso de colgajos microquirúrgicos puede verse limitado por la extensión o la misma longitud de su pedículo vascular, sin poder ser almacenado en caso de existir un excedente.

Dentro de los injertos autólogos de hueso tenemos que hacer una importante diferenciación entre el injerto libre de hueso, entendiendo como este al fragmento de hueso que se trasplanta de una región del cuerpo del mismo paciente a otra sin vascularización, la cual la obtendrá del lecho receptor (figura 16) (Kademani & Keller, 2006), frente al colgajo óseo libre, el cual se obtiene de una porción del hueso con su propia vascularización y se anastomosa a vasos cercanos al defecto para obtener la vascularización necesaria (p.ej. el colgajo libre de peroné).

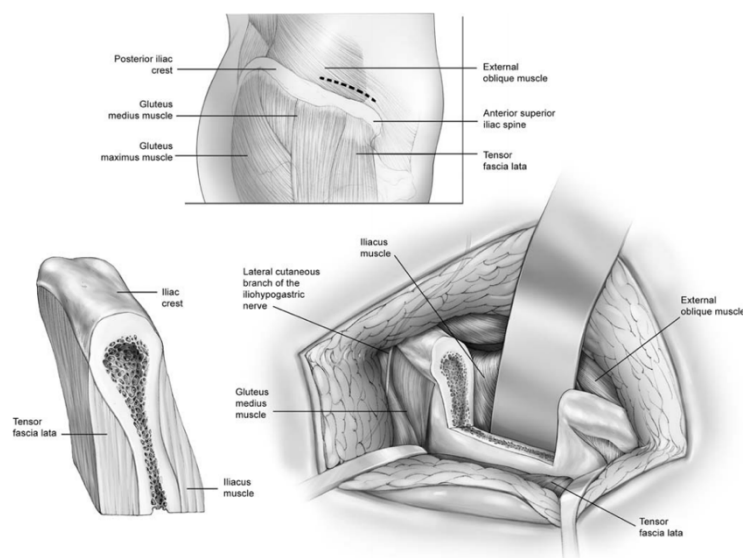


Figura 16: Tallado de injerto libre de cresta iliaca (Kademani & Keller, 2006).

En casos de defectos de mayor amplitud, se precisa utilizar técnicas más complejas como la distracción ósea o el uso de colgajos microvascularizados. Todos estos procedimientos tienen desventajas como son la alta tasa de complicaciones frente a otras técnicas, o los periodos prolongados de convalecencia (figura 17).

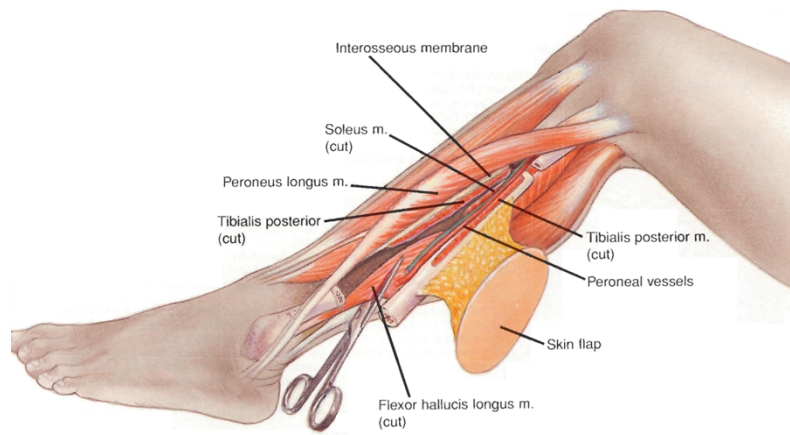


Figura 17: Tallado de colgajo peroneo. (Urken, 2007).

3.3. Injerto alogénico

Entendemos como injerto alogénico, homólogo o aloinjerto, aquel que no procede de la misma persona, pero si de un miembro de su misma especie. Durante los últimos 30 años estos tipos de injerto han tenido un crecimiento exponencial desarrollándose una amplia gama de diferentes tipos de materiales como matriz ósea desmineralizada, hueso de cadáver liofilizado, injertos cortico-esponjosos o solamente corticales o hidroxapatita.

Entre las principales ventajas que presentan los injertos alogénicos se encuentran la ausencia de morbilidad en la región donante frente a los injertos autólogos. El no presentar limitación de tejidos es otra de las ventajas asociadas a estos injertos, los cuales se caracterizan por presentar capacidad osteoconductiva e incluso en algunos casos capacidad osteoinductora.

Entre las desventajas existe un aumento de riesgo de respuesta inmune e infección ya que a pesar de que estos injertos son tratados para eliminar su antigenicidad, al proceder de otros especímenes existe este riesgo. Por otro lado, la ausencia de células hace que este tipo de injerto no posea capacidad osteogénica.

3.4. Injerto Xenógeno

Se tratan de aquellos materiales cuya fuente es un animal de otra especie (xenoinjerto), por lo que se trasplantan aún más antígenos extraños que en los injertos alogénicos.

Los xenógenos son injertos de origen natural que provienen de otra especie y contienen los minerales naturales del hueso. Por ejemplo, hueso bovino y derivados del coral (Ostrix, Osteogen, Bio-Oss, Interpore).

El uso de hueso mineral desproteinizado de bovino (Bio-oss, Osteohealth Suiza) ha sido estudiado y se ha comprobado que ofrece verdaderas ventajas en zonas de alta demanda estética, ya que sirve como apoyo para el tejido blando.

3.5. Biomateriales

Entendemos por biomaterial, material biocompatible o material bioaplicable a aquel material de origen sintético u orgánico utilizado con la función de crear un dispositivo capaz de suplir la función de una parte del organismo humano, o bien de interaccionar con los tejidos humanos sin provocar un rechazo inmunológico.

Varios biomateriales se han utilizado como sustitutos óseos, desde metales, a cerámicas bioactivas incluyendo cerámicas con fosfato cálcico y fosfato tricálcico, cementos bioactivos, los cuales aportan una matriz sobre la cual las células óseas pueden migrar, proliferar y diferenciarse (Guo y cols., 2013). En la figura 18 podemos observar la evolución histórica de los biomateriales.

Los biomateriales más utilizados en medicina han sido históricamente el titanio y el acero teniendo múltiples ejemplos como: válvulas cardíacas, marcapasos, máquinas de diálisis o prótesis ortopédicas.

Las características que debe presentar el biomaterial ideal en regeneración ósea son las siguientes:

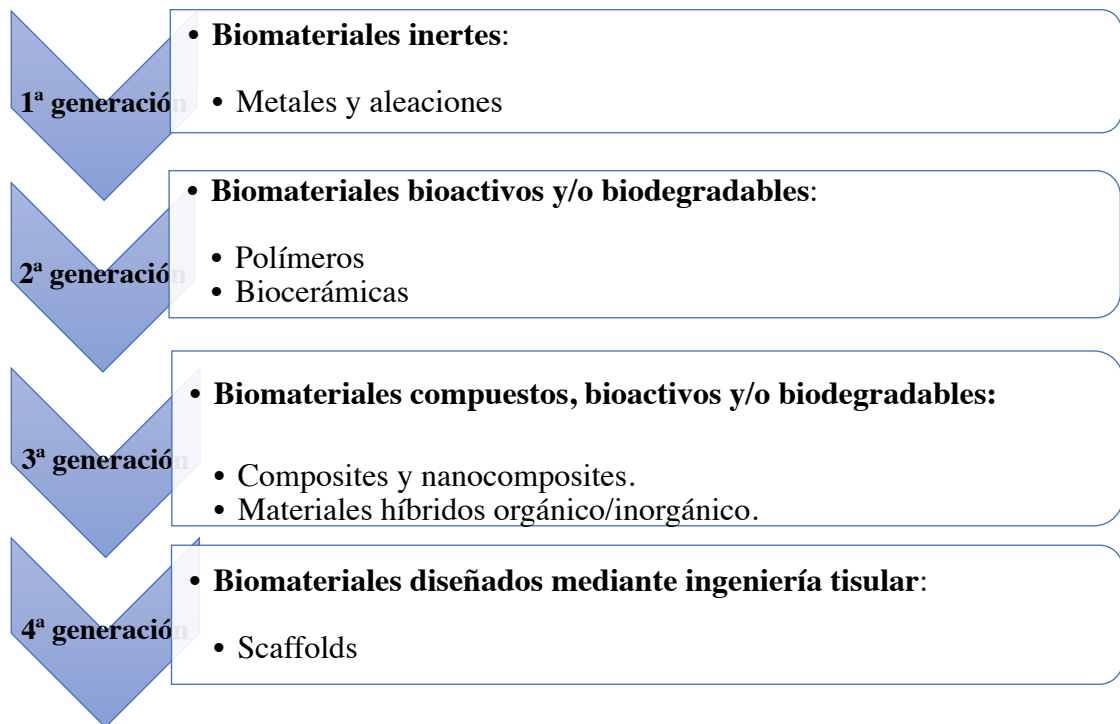


Figura 18: Evaluación histórica de los biomateriales.

- **Mecanotransducción:**

El hueso humano tiene unas propiedades distintas en función de su localización y las cargas que soporta, uno de los principales problemas que ha tenido la ingeniería de tejidos ha sido lograr implantes que posean las propiedades adecuadas a cada localización.

La carga soportada en esa localización puede conllevar una fractura del implante, pero un exceso de resistencia mecánica a ese nivel puede frenar la mecanotransducción conllevando una reabsorción ósea del hueso adyacente al implante, pudiendo acabar en fracturas patológicas. Este concepto conocido en la literatura anglosajona como “stress shielding”, es uno de los principales problemas de los implantes macizos clásicos.

Los materiales biodegradables pueden compaginar las propiedades mecánicas del hueso esponjoso y su posterior reabsorción para evitar los fenómenos de reabsorción asociados a las fuerzas mecánicas.

- **Porosidad:**

La porosidad ha demostrado ser un factor crítico en la integración de los implantes. La porosidad de un dispositivo permite el crecimiento celular y de vasos a través de él, favoreciendo una mejor organización del crecimiento celular, así como la creación de una matriz extracelular.

Respecto a la porosidad óptima sigue siendo un objeto a debate. Parece estar establecido que la mínima porosidad necesaria para que exista un correcto crecimiento celular es de 200 μm , ya que por debajo de este tamaño disminuye la aportación de oxígeno y la difusión de los nutrientes a través del dispositivo (Van Der Stok y cols., 2013). Existen diferentes técnicas para lograr esta porosidad que desarrollaremos más adelante.

- **Estructura microscópica:**

El control de la estructura microscópica ha sido uno de los grandes avances en la ingeniería de tejidos en los últimos años. El implante actúa como andamiaje sobre el que se adhieren las células y guía su crecimiento.

Los componentes de la matriz extracelular del hueso tienen un tamaño microscópico, por lo que tiene sentido que si queremos simular a la misma tenemos que hacerlo también a este nivel. Cambios en la superficie y en la estructura microscópica han permitido aumentar la superficie de contacto de los implantes con el hueso colindante y aumentar su rugosidad permitiendo una mejor adhesión de las células y una mejor osteointegración.

- **Migración celular:**

Es conocida la acción de las células madre mesenquimales cuando existe una agresión tisular, migrando a través del sistema sanguíneo a la localización donde se ha producido el daño.

Un nuevo enfoque ha sido tratar de fomentar esta migración tisular para

favorecer la regeneración ósea, bien actuando sobre las células progenitoras modificándolas para expresar marcadores que las guíen a la zona dañada o bien a nivel del implante favoreciendo la llegada de estas células.

Los principales materiales que componen los biomateriales en nuestros días son los metales, los materiales poliméricos, los materiales cerámicos y los materiales biológicos. A continuación, desarrollaremos cada uno de estos materiales con más detenimiento.

A. Metales

Los metales son elementos químicos que, tras su procesamiento, se utilizan (en su mayoría) como conductores del calor y la electricidad, y como elementos estructurales. Los metales son materiales fáciles de reciclar y todos pueden ser fundidos y cambiar su forma.

Los metales presentan todas o gran parte de las siguientes propiedades físicas: estado sólido a temperatura ambiente (a excepción del mercurio que es líquido); opacidad, excepto en capas muy finas; son buenos conductores eléctricos y térmicos; son brillantes, una vez pulidos, y tienen estructura cristalina en estado sólido.

El 75% de los elementos de la tabla periódica son metales (Figura 19), aunque pocos son utilizados como biomateriales por su biocompatibilidad. Parte de estos metales (p.ej. Hierro y Magnesio) forman parte de nuestro organismo, aunque sea en pequeñas cantidades.

Hasta el siglo XVIII, los materiales metálicos utilizados como implantes quirúrgicos eran fundamentalmente el oro y la plata, siendo en el siglo XIX cuando empezaron a utilizarse los aceros, y ya en este siglo aparecieron los aceros inoxidables, las aleaciones de cromo-cobalto y molibdeno. No es hasta la década de los años 40 del siglo XX cuando se introdujeron el titanio y sus aleaciones en el campo de la medicina.

La imagen muestra una tabla periódica de los elementos. Los elementos metálicos utilizados como biomateriales están resaltados en verde. Estos incluyen: Fe, Cr, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Xe, Ba, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Xe, Cs, Rb, K, Na, Li, H, He, Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra, Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Po, At, Rn, Fr, Ra, Ac, Th, Pa, U, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No, Lr, Rf, Db, Sg, Bh, Hs, Mt, Ds, Rg, Cn, Nh, Fl, Mc, Lv, Ts, Og.

Figura 19: Tabla periódica, con los elementos metálicos utilizados como biomateriales remarcados.

Dentro de los metales, los más frecuentemente utilizados como biomateriales son:

- Acero inoxidable

Entendemos al acero inoxidable como la aleación de hierro (Fe) más cromo (Cr), con otros elementos para mejorar sus propiedades.

El primer implante de acero inoxidable utilizado como biomaterial estaba compuesto de una aleación de Fe con 18% de Cr y 8% de Niquel (Ni) (18-8). Posteriormente se han ido añadiendo más elementos que han mejorado sus propiedades (p.ej. si se le añade Molibdeno 2-4% mejora la resistencia a corrosión en solución salina). Actualmente la aleación más utilizada es la conocida como AISI 316L (American Iron and Steel Institute).

Las aplicaciones del acero inoxidable dentro de la medicina han sido principalmente en forma de dispositivos mecánicos (Figura 20): placas, tornillos, instrumental quirúrgico, implantes ortopédicos (vástagos, parte acetabular de las prótesis de cadera...) aunque han sido relegadas estas últimas por presentar problemas de fatiga al tener un elevado módulo elástico y alta densidad.

Entre las principales desventajas del acero inoxidable encontramos su alta densidad (aproximadamente 8000 Kg/m³), al tratarse de dispositivos pesados. También presenta alta rigidez con un módulo elástico de aproximadamente 190-200GPa, lo que favorece la absorción ósea perimplantaria por el concepto de “stress shielding”.

Otro de sus inconvenientes es el no ser un metal bioactivo, por lo que no se osteointegra, precisando tornillos, cemento óseo o recubrimientos con otros elementos para permanecer adherido al hueso.

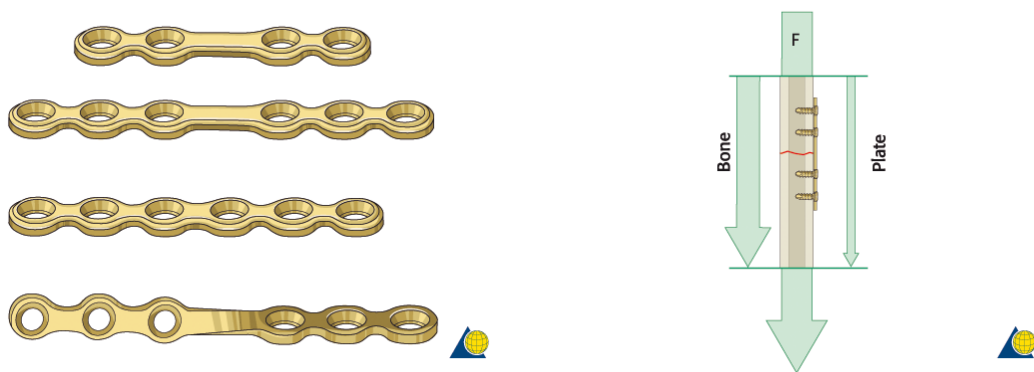


Figura 20: A la izquierda de la imagen se aprecian miniplacas de acero utilizadas en traumatología facial. A la derecha se observa un esquema que representa el concepto de cargas compartida por el hueso y la miniplaca. Imagen obtenida de www.aofoundation.com.

Por último, también presenta corrosión junto a otros elementos metálicos, pobre comportamiento al desgaste, y posibles complicaciones por alergia al Níquel.

- Cromo-Cobalto

En 1924, Zierold empleaba ya como material implantario una aleación que fue difundida en 1937 por Venable bajo el nombre de Vitallium. En numerosos trabajos ha quedado demostrado que, si bien el cobalto podía ser citotóxico, a partir del momento en que era combinado con algunos metales bien definidos, la aleación se comportaba

como un material inerte y no tóxico. Así, la toxicidad del cobalto se encuentra neutralizada por la presencia del cromo y desaparece.

Encontramos distintos tipos de aleaciones en función de su composición, en todas ellas el elemento más abundante es el Cobalto y luego el Cr (aproximadamente a la mitad que el cobalto), como se muestra en la tabla 4. Su principal uso ha sido en la cirugía protésica y también tiene un importante papel en la implantología dental, se utiliza en colados dentales de prótesis parciales y en la realización de puentes dentales.

Tabla 4: tipos de aleaciones de Cromo-Cobalto en función de su composición (% masa).

	<i>F75</i>	<i>F90</i>	<i>F562</i>	<i>F563</i>
<i>Co</i>	60	50	35	45
<i>Cr</i>	27-30	19-21	19-21	18-22
<i>Mo</i>	5-7	-	9-10,5	3-4
<i>Ni</i>	<2,5	9-11	33-37	15-25
<i>Fe</i>	<0,75	<3	<1	4-6
<i>W</i>	-	14-16	-	3-4

Entre las principales ventajas de la aleación Cr-Co se encuentran sus buenas propiedades mecánicas y tener una alta resistencia a la corrosión en solución salina y una alta resistencia al desgaste. Además, presenta buena resistencia a la fatiga y una alta durabilidad, siendo fácil de pulir para acabados especulares (superficies lisas).

Entre sus principales desventajas se encuentran su alta densidad ($>8000 \text{ kg/m}^3$) y alta rigidez (Elasticidad = 230 GPa), estimulando a los osteoclastos y conllevando la absorción del hueso adyacente. Por otro lado, presenta unas pobres propiedades

tribológicas contra si mismo (si dos piezas rozan no funciona, no siendo adecuado su uso como prótesis).

- Titanio

El titanio ha sido y es uno de los principales metales utilizados como biomaterial. Fue descubierto por un químico, y mineralista británico llamado William Gregor en el año 1791, quien descubrió una sustancia en el río Hertford, que tenía un aspecto de arena negra, y presentaba propiedades magnéticas, conocido como ilmenita, de este material obtuvo el óxido de Titanio. Fue Martin Heinrich Klaproth quien tres años más tarde halló el mismo elemento en el rutilo dándole el nombre de Titanio, inspirándose en los titanes de la mitología griega.

En 1910, Matthew Albert Hunter aisló el metal calentando tetracloruro de titanio (TiCl_4) con sodio. Finalmente fue el luxemburgués Wilhelm Justin Kroll el reconocido internacionalmente como el padre de la industria del titanio, pues aún hoy se utiliza su método para la obtención de titanio a partir de sus óxidos con un alto grado de pureza.

Fueron Bothe y Beaton los que, mediante la implantación en animales, observaron su excelente biocompatibilidad comparable a la del acero inoxidable o a la del Vitallium (CoCrMo). Se trata de un metal de transición de color gris, baja densidad y alta resistencia mecánica, el cual es muy resistente a la corrosión por agua del mar, agua regia y cloro, gracias a la capa de TiO_2 que se forma en su superficie de forma natural.

El alto precio de mercado del titanio puro se debe a su dificultad para obtenerlo, viéndose continuamente afectado por las fluctuaciones del mercado debido a su uso en la industria aeronáutica. Esto hace que exista un gran interés por la obtención del titanio a partir de sus óxidos, ya que esto puede llegar a reducir los costes del titanio en hasta un 50%.

El titanio presenta una alta resistencia a la corrosión cuando más puro es, pero a mayor pureza asocia peores propiedades mecánicas. Para tratar de mejorar las propiedades del metal puro, se han desarrollado aleaciones mediante la adición de otros

elementos que favorecen las prestaciones de este metal.

El titanio sin alear tiene una estructura hexagonal compacta (fase α), que a los 885 °C cambia a una estructura cúbica (fase β) centrada en el cuerpo, que se mantiene hasta la temperatura de fusión. El principal efecto de los elementos de aleación en las aleaciones de titanio es la modificación de la temperatura de transformación. De esta manera, los elementos de aleación se clasifican en:

- α –estabilizadores: que elevan la temperatura de transformación.
- β –estabilizadores: que hacen que descienda.
- **Aleaciones tipo alfa:** las aleaciones alfa comprenden las variedades de Ti puro comercial y las aleaciones que contienen elementos de aleación alfégenos o neutros (Ti+ Al+ Sn).

El aluminio es el principal α –estabilizador. El aluminio tiene una gran solubilidad en el titanio y provoca el aumento de la resistencia de la fase α . El resultado de esto es un ligero aumento de la resistencia a temperatura ambiente, pero que se mantiene a temperatura elevada.

Posee la máxima resistencia a la tracción y a la corrosión a elevadas temperaturas (316 a 538 °C), y las mejores características para soldadura respecto a todos los grados de titanio. Sin embargo, a temperatura ambiente los valores de resistencia son los más bajos, y no admite tratamiento térmico. Ejemplos de este tipo de aleaciones son: Ti-3Al-6Sn-5Zr-0.5Mo-0.5Si y Ti-5Al-6Sn-2Zr-1Mo-0.25Si.

Otros elementos α –estabilizadores son el oxígeno, el estaño, el galio o el germanio. El nitrógeno o el carbono son también α -estabilizadores, pero no suelen ser añadidos intencionadamente

- **Aleaciones tipo beta:** se caracteriza por tener una estructura cristalina cúbica centrada en el cuerpo a temperatura ambiente. Estas se logran añadiendo elementos como vanadio, cromo, niobio o tántalo.

Las propiedades óptimas de las aleaciones β no se consiguen cuando su estructura esta formada por fase β exclusivamente, sino que éstas se alcanzan al realizar un tratamiento de envejecimiento que provoca la precipitación de finas partículas de α dentro de los granos β .

Se trata de una aleación más resistente y dúctil que la alfa, combinando tenacidad y resistencia a la fatiga. Se tratan de las más versátiles dentro de las aleaciones de titanio, con un bajo módulo elástico y buena resistencia a la corrosión. Es por ello por lo que se trata de un material muy adecuado para implantes quirúrgicos.

- **Aleaciones alfa + beta:** se caracterizan por responder bien a tratamiento térmico y tener un alto límite de fatiga, por lo que es la de mayor interés industrial, pero son menos maleables que las aleaciones tipo alfa.

Estas aleaciones tienen una resistencia mecánica a temperatura ambiente mayor que las aleaciones tipo alfa, aunque menor que las tipo beta.

El más utilizado es Ti+6%Al+4%V, se caracteriza por tener una buena resistencia, soldabilidad, friabilidad y buen comportamiento frente a la fatiga, teniendo mal comportamiento a altas temperaturas, representando más del 50% del titanio empleado.

Existen cuatro grados de titanio sin alear normalizados para implantes quirúrgicos, dependiendo del contenido de impurezas (oxígeno, nitrógeno, carbono, hidrógeno y hierro) que afectan a sus propiedades mecánicas. En la tabla 5 incluimos los dos grados más utilizados en biomedicina y las aleaciones más habituales.

El Titanio tiene una baja resistencia al desgaste, no siendo un buen remplazo en zonas con un alto desgaste (p.ej. cabeza de fémur). Si se quiere mejorar su resistencia al desgaste se puede hacer un tratamiento superficial (por ejemplo, con TiN). Tiene una rigidez (elasticidad = 100-120 GPa) más similar a la del hueso comparado con el acero inoxidable, por ello tiene unas menores tasas de absorción.

La resistencia del titanio y sus aleaciones es en general inferior a las de acero inoxidable AISI 316 y a las de las aleaciones base cobalto, pero con relación a su resistencia específica (resistencia/densidad), las aleaciones de titanio son superiores a las demás.

Tabla 5: propiedades mecánicas de los distintos tipos de titanio.

	Grado 1	Grado 4	Ti6Al4V	Ti3Nb13Zr
<i>Resistencia a la Tracción (MPa)</i>	240	550	860	1030
<i>Límite elástico (MPa)</i>	170	485	795	900
<i>Deformación en rotura (%)</i>	24	15	10	15
<i>Módulo elástico de Young (GPa)</i>	102,7	104,1	110-114	79,84

Otra de las ventajas del titanio en aplicaciones biomédicas es que su módulo de Young es de 110 GPa, frente al acero inoxidable y a las aleaciones base cobalto, cuyo módulo de elasticidad es de 200 GPa y 220 GPa respectivamente. El módulo elástico del hueso cortical es de 20 GPa, por lo que el titanio presenta un módulo elástico más cercano al del tejido natural que las otras dos aleaciones. Algunas aleaciones de titanio, especialmente las tipo beta, pueden tener menores valores del módulo de Young, es por eso que existe un gran interés en su desarrollo dentro del campo de la biomedicina.

El titanio y sus aleaciones poseen una excelente resistencia a la corrosión, ya que la rápida reacción del titanio con el oxígeno produce una fina capa superficial de óxido impermeable y por lo tanto protectora. Este comportamiento, que tiene también lugar en el aluminio, es más eficiente en el titanio, dando lugar a una resistencia tanto a la oxidación como a la corrosión superiores. Todo ello justifica su uso en la industria química y en ambientes altamente corrosivos, y en particular hace del titanio y sus aleaciones los metales más adecuados para la fabricación de implantes quirúrgicos. Sin embargo, el titanio tiene una pobre resistencia a cizalladura, por lo que no es adecuado para tornillos óseos y clavos.

Uno de sus principales inconvenientes es su coste, ya que al ser un metal tan reactivo hay que procesarlo en vacío. Este procedimiento encarece su precio.

Las aplicaciones actuales del Titanio en el campo de la medicina son muy numerosas, con un gasto anual de aproximadamente de 1000 toneladas. Es utilizado en cirugía ortopédica para el remplazo de hueso y articulaciones, así como para la fijación de fracturas óseas. Uno de sus grandes usos es en la rehabilitación implantológica dental, donde hoy en día la mayoría de los implantes están compuestos por Titanio y sus distintas aleaciones. También es utilizado para la fabricación de instrumental quirúrgico, dispositivos cardiovasculares y prótesis externas.

- Nitinol

Entendemos por Nitinol a la aleación compuesta por Níquel y Titanio (con una distribución aproximada del 50% de cada uno de los materiales). Tiene memoria de forma debido a que puede tener dos fases estables en función de la temperatura. A baja temperatura tiene menor límite elástico, resistencia y dureza, mientras que a alta temperatura presenta mejores propiedades mecánicas.

Una de sus funciones es en ortodoncia para la fabricación de arcos dentales, pudiendo recuperar grandes deformaciones por su memoria de forma y superelasticidad (deformaciones de hasta un 10% recuperables).

Entre sus principales aplicaciones en biomedicina se encuentra su uso para la

fabricación de stents cardiacos al tener memoria y poder recuperar la forma. También se utiliza en el desarrollo de prótesis valvulares cardiacas y como hemos comentado en ortodoncia dental (Figura 21).

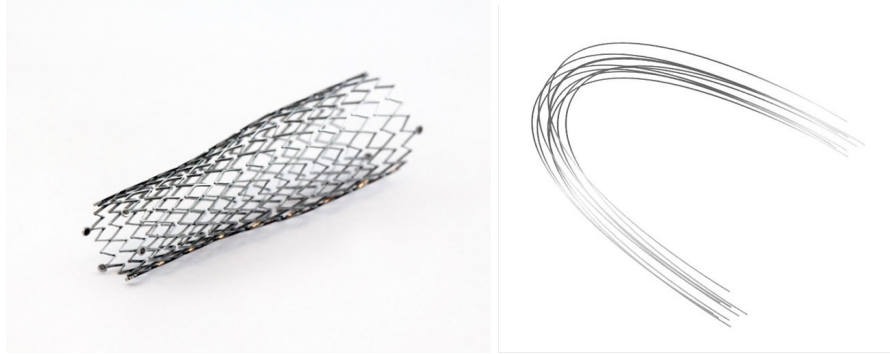


Figura 21: imagen de stent coronario a la izquierda; a la derecha arcos de ortodoncia dental desarrollados con Nitinol.

- Magnesio

Se trata de un material biodegradable y absorbible en el cuerpo, siendo el 4º catión más común en nuestro organismo ($0.7-1.05 \text{ mmol/L}$), presentando propiedades mecánicas muy similares a las del hueso.

Entre sus principales ventajas se encuentran el tratarse de un material biodegradable, favorece la osteogénesis incorporando calcio al hueso favoreciendo la osteointegración y formación de hueso. Además, su exceso puede ser secretado por orina.

Entre sus desventajas se encuentra la rápida disolución que presenta en los fluidos corporales, produciendo picos de Mg en el cuerpo que puede alterar la neurotransmisión pudiendo producir parálisis, disnea, eventos cardiovasculares, etc. También la rápida degradación afecta a las propiedades mecánicas del propio implante.

Para intentar disminuirlo existen recubrimientos con otros elementos o la posibilidad de utilizar aleaciones con otros metales. En la tabla 6 podemos comparar las características mecánicas de los distintos tipos de metales en comparación con las propiedades del hueso.

Tabla 6: Tabla resumen de las características mecánicas de los distintos tipos de metales en comparación con el hueso humano.

PROPIEDAD	HUESO	MAGNESIO	TITANIO	Co-Cr	ACERO INOX
<i>Densidad (g/cm³)</i>	1.8-2.1	1.7-2.0	4.4-4.5	8.3-9.2	7.9-8.1
<i>Módulo elástico (GPa)</i>	3-20	41-45	110-117	230	189-205
<i>Límite elástico (MPa)</i>	130-180	65-100	760-1120	450-1000	170-310
<i>Tenacidad (MPa- √m)</i>	3-6	15-40	55-115	275	50-200

B. Materiales poliméricos

Los materiales poliméricos se tratan de macromoléculas conformadas por la unión de monómeros mediante enlaces covalentes, formando largas cadenas que se unen entre si por fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrogeno o interacciones hidrofóbicas.

Su utilización en el campo de la medicina es amplia en varios campos como se puede apreciar en la tabla 7.

Tabla 7: Aplicaciones de los materiales poliméricos en función del campo de la medicina.

<i>Campo</i>	<i>Aplicaciones</i>
<i>Oftalmología</i>	Lentes intraoculares, implantes de retina y córnea
<i>Cardiovascular</i>	Implantes, válvulas cardíacas, marcapasos
<i>Estética</i>	Implantes mamarios, nariz
<i>Ortopedia</i>	Cadera, rodilla, hombro, uniones en dedos
<i>Otros</i>	Catéteres, membranas para diálisis

Los clasificaremos en:

- No degradables:
 - Polietileno (PE)
 - Polimetimetacrilato (PMMA)
 - Politetrafluoretileno (PTFE)
- Degradables:
 - Colágeno
 - Celulosa
 - Quitina
 - Ácido poliláctico
 - Ácido poliglicólico
 - Policoprolactona

B.1. Biomateriales poliméricos no degradables

Entendemos como materiales poliméricos no degradables a aquellos diseñados para mantener sus propiedades a largo plazo.

-Polietileno (PE)

Se trata del polímero más simple respecto a su composición química, siendo uno de los plásticos más utilizados a nivel mundial debido a la simplicidad en su fabricación y el bajo precio del mismo. Sus aplicaciones son numerosísimas.

El más utilizado es el de ultra-alto peso molecular, principalmente en prótesis articulares (Figura 22). Entre sus características presenta gran resistencia al desgaste y bajo coeficiente de fricción. Se suele tratar su superficie para ser altamente reticulado y mejorar su resistencia a la fricción.



Figura 22: Prótesis de articulación temporomandibular, donde el componente de la fosa glenoidea está compuesto por polietileno. Imagen obtenida de www.fixmedical.com

-Polimetilmetacrilato (PMMA)

Se caracteriza por tener una buena transparencia. El acrílico se diferencia de otros polímeros en cuanto a resistencia a la intemperie, transparencia y resistencia al rayado.

Estas propiedades hacen que sea utilizado en la industria del automóvil, iluminación, cosméticos, construcción y óptica, entre muchas otras. Como biomaterial es utilizada la resina de PMMA para la fabricación de prótesis óseas y dentales y como aditivo en

polvo en la formulación de fármacos en comprimidos de administración por vía oral. En este caso actúa como retardante a la acción del medicamento para que esta sea progresiva.

Previamente se utilizaba también para la fabricación de prótesis oculares, aunque actualmente se emplean hidrogeles. Sus aplicaciones en biomedicina hoy en día son variadas como lentes intraoculares en aquellos pacientes que han sido sometidos a una faquectomía tras el tratamiento de cataratas, también se emplea como cementos óseos en cirugía ortopédica para fijar los implantes y en cirugía cosmética.

-Politetrafluoretileno (PTFE, teflón)

Se trata de un polímero similar al polietileno, caracterizado por tener un bajo coeficiente de fricción para baja resistencia a desgaste.

Al tratarse de un material inerte no se integra en el organismo por lo que ha sido utilizado como recubrimiento en catéteres y suturas para evitar la adherencia bacteriana y disminuir la tasa de infecciones.

Presenta alta tasas de resistencia a los cambios de temperatura y a la electricidad por lo que mayoría de su uso es en la industria aeroespacial e informática.

En medicina su principal aplicación es cuando deseamos que el material no se integre en el cuerpo humano como es el caso de las prótesis endovasculares (Figura 23).

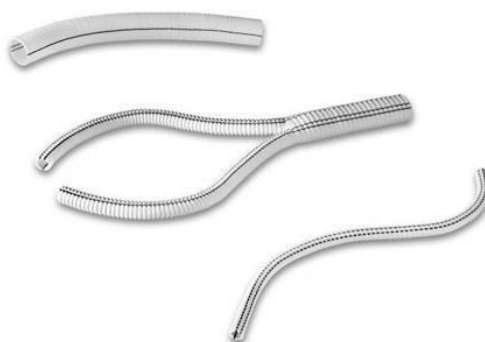


Figura 23: Imagen de distintos tipos de prótesis endovasculares compuestas por PTFE. Imagen obtenida de www.medicaexpo.es

B.2. Biomateriales poliméricos degradables

Entendemos por biomateriales degradables aquellos con una duración limitada en el tiempo. La biodegradación es la descomposición química gradual de un material mediado en o por un sistema biológico, siendo este último la causa del proceso de degradación.

Dentro de los mecanismos de acción de estos materiales pueden tener distintos usos, como por ejemplo servir de soporte hasta que se consigue la regeneración del tejido, ya que el implante se degrada paulatinamente a la vez que crece el tejido sobre el.

Otro de sus usos es para la liberación controlada de fármacos, ya que el mismo implante libera productos de degradación que lo van eliminando.

Dividiremos los polímeros degradables en dos grupos, aquellos de origen natural que podemos encontrar en la naturaleza, y aquellos artificiales o sintéticos.

-Naturales

- Colágeno

Se trata de una molécula proteica presente en todos los animales. Los diferentes tipos de colágeno constituyen el 25% de la masa total de proteínas en los mamíferos siendo el componente más abundante en piel y huesos.

El uso del colágeno en Medicina es muy extenso. Se utiliza en cirugía cosmética y en tratamientos de heridas en pacientes con quemaduras. También se utiliza extensamente para la reconstrucción del hueso y en una amplia variedad de propósitos dentales, ortopédicos y quirúrgicos.

- Celulosa

Se trata de un polisacárido, es la biomolécula más frecuente en la masa terrestre. En el campo de la medicina se utiliza principalmente como apósito o material quirúrgico.

- Quitina

La quitina se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza junto con la celulosa. Sus fuentes principales de obtención son el exoesqueleto de los invertebrados, sobre todo artrópodos (crustáceos e insectos), hongos, algas y moluscos. La principal fuente industrial de este biomaterial procede del tratamiento de caparzones de crustáceos (producto de desecho de la industria pesquera).

-Artificiales o sintéticos

- Ácido poliglicólico (PGA)

Se trata de un polímero biodegradable, termoplástico, bastante cristalino. Su estructura es bastante rígida y su capacidad de ser procesado es limitada.

Se trata de la primera sutura reabsorbible y actualmente se utiliza en suturas y regeneración ósea. Su duración es de unas semanas.

- Ácido poliláctico (PLA)

Existe en dos formas, en función del enantiómero. El PLLA (poliácido-L-láctico) con un 37% de cristalinidad y el PDLA (poliácido-D-láctico), que es más estable. Ambas formas sufren hidrólisis y produce la degradación de la sustancia ya que el ácido láctico se metaboliza. Puede durar un año.

- Copolímeros de ácido láctico y glicólico (PLGA)

El más utilizado, con una rápida degradación. Nace de la combinación de PGLA y PLA. Es utilizado en suturas (Vicryl), matrices con control de liberación en fármacos y en estructuras para ingenierías de tejidos.

Esta combinación cada vez es más utilizada en osteosíntesis en el área maxilofacial, no solo en pacientes en edad pediátrica, sino también en adultos. Aunque todavía

presentan algunas desventajas en relación con el titanio, como la mayor incomodidad de uso y el coste económico. La experiencia acumulada demuestra que es una alternativa válida a la osteosíntesis con titanio en la mayoría de las situaciones clínicas.

- Policoprolactona (PCL)

Se trata de un polímero de degradación lenta, utilizado principalmente para la liberación controlada de fármacos.

También es especialmente interesante para la preparación de dispositivos implantables a largo plazo, debido a su degradación, que es incluso más lenta que la de poliláctida. La PCL ha sido aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA) en aplicaciones específicas utilizadas en el cuerpo humano como, por ejemplo, un dispositivo para suministro de fármacos, sutura (vendido bajo la marca Monocryl) o barrera de adhesión.

C. Materiales cerámicos

Definimos a los materiales cerámicos como aquellos materiales inorgánicos constituidos por elementos no metálicos, y metálicos consolidados mediante tratamiento térmico a altas temperaturas. Presentan enlaces iónicos (entre elemento metálico y no metálico), enlaces covalentes (elementos no metálicos con electronegatividades similares) o ambos (Figura 24). Pueden ser cristalinos, no cristalinos o una mezcla de ambos. Los cristalinos presentan orden tridimensional de largo alcance, los amorfos no.

Según su estructura pueden distinguirse en materiales cristalinos o cerámicos, o en materiales no cristalinos o vidrios. Dentro de los cristalinos se dividen en monocristalinos o policristalinos.



Figura 24: Materiales cerámicos.

Los materiales cerámicos se encuentran históricamente entre los materiales más antiguos desarrollados por el hombre. Entre los materiales cerámicos utilizados como biomaterial se encuentran la alúmina (Al_2O_3), Zirconia (ZrO_2), titania (TiO_2), fibra de carbono e Hidroxiapatita. La producción de los polvos cerámicos puede ser por molienda de los minerales o bien por reacción química. Una vez tenemos los polvos los aglutinamos y conformamos. Finalmente, se realiza un tratamiento térmico, primero de secado y eliminación del aglutinante y luego se realiza la sinterización. La fabricación de los materiales cerámicos suelen tener un coste bajo, pero su procesado hasta lograr el producto final normalmente es lento y laborioso.

Entre las principales propiedades de los materiales cerámicos se puede destacar que presentan un alto valor de dureza con baja densidad, un módulo elástico elevado (Zirconia 220 GPa, Alúmina 380-420 GPa), lo cual confiere al material una alta rigidez. Son materiales con resistencia al desgaste, pero que presentan fragilidad. Son buenos aislantes al tener baja conductividad térmica y eléctrica, y alta resistencia al ataque químico. Por último, presentan mayor resistencia a altas temperaturas que otros materiales.

Tipos:

- Bioinertes:

Entendemos por materiales cerámicos bioinertes a aquellos materiales que no reaccionan con el medio donde se implantan. Son materiales en los que se busca que tengan unas propiedades físicas que se adapten de la mejor manera posible a las de los tejidos a reemplazar, ya sea hueso o cualquier otro tejido

reemplazable, no reaccionando o haciéndolo mínimamente con los tejidos circundantes a la prótesis.

Los ejemplos más comunes son Alúmina y Zirconia. Se utilizan en remplazos de prótesis articulares y prótesis dentales por su dureza y resistencia al desgaste.

- Bioactivas:

Son aquellos materiales que tienen una reacción controlada con los fluidos fisiológicos, proporcionando una respuesta biológica en la interfase del material promoviendo la unión directa con el tejido donde se implanta (aunque presentan peores propiedades mecánicas).

Ejemplos dentro de este grupo son los vidrios bioactivos de silicio y la hidroxiapatita.

- Bioabsorbibles:

Estos materiales son absorbidos gradualmente in vivo y reemplazados por el hueso. Están diseñados para estimular la respuesta celular específica a nivel molecular, buscando interactuar con el tejido de forma específica.

Dentro de este grupo se encontrarían los fosfatos cálcicos.

D. Materiales biológicos. Técnicas celulares

Las técnicas celulares son uno de los grandes avances dentro de la ingeniería de tejidos en las últimas décadas, constituyendo una revolución en las posibilidades regenerativas que estas aportan. El descubrimiento de las células madre abre un campo inimaginable previamente en la ingeniería de tejidos. Las células madre poseen la capacidad de regenerarse, y bajo unas condiciones adecuadas pueden diferenciarse a diferentes tipos de células para sustituir a células dañadas de tejidos y órganos. La

posibilidad de obtener células con la capacidad de diferenciarse en cualquiera de los tejidos de nuestro organismo puede ser un paso para recuperar la función de órganos que la han perdido, como puede ser el páncreas en pacientes enfermos de diabetes o la regeneración neuronal en aquellos pacientes que han sufrido un ictus y tienen enfermedades neurodegenerativas. La posibilidad de eliminar el rechazo inmunológico en los trasplantes y evitar la inmunosupresión asociada hoy en día al trasplante de órganos es otro de sus posibles avances.

Dentro de la regeneración ósea, la posibilidad de disponer de células capaces de diferenciarse en cualquiera de las líneas osteogénicas puede ser una alternativa a la reconstrucción de grandes defectos óseos, permitiendo sobre un andamiaje que estas células regeneren el hueso perdido, evitando las morbilidades asociadas a las técnicas reconstructivas que se utilizan actualmente para la reparación de defectos óseos de gran tamaño. La terapia celular es una base clave en la ingeniería tisular. Esta consiste en la trasplantación o inyección de células vivas para tratar diferentes patologías.

El auge de la inmunología con la realización de los primeros trasplantes de órganos son la raíz sobre la que se ha desarrollado la terapia celular. El sistema inmune controla la respuesta del huésped ante el órgano trasplantado por lo que el control del mismo es fundamental para evitar dos de los principales problemas que tienen los trasplantes:

- El rechazo al trasplante: es una reacción inmunológica dirigida contra aloantígenos (antígenos que difieren entre individuos de la misma especie). Estos aloantígenos corresponden principalmente (aunque no exclusivamente) a las moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC/HLA). En las últimas décadas la mejoría en las tasas de éxito de los trasplantes se ha basado más en los progresos en las terapias inmunosupresoras más que a las mejoras de la tipificación antigénica.
- La conocida como enfermedad injerto contra huésped (EICH): es la situación opuesta al rechazo de trasplante. Las células del donante reconocen como extrañas los tejidos del individuo receptor atacándolas.

Este segundo problema aparece a raíz de los trasplantes de médula ósea, considerado como uno de los primeros hitos de la terapia celular, antes incluso del descubrimiento de las células madres (Thomas, Lochte, Lu & Ferrebee, 1957).

El descubrimiento de las células madre provenientes de la sangre del cordón umbilical establece el punto cuando se considera que la terapia celular es capaz de regenerar tejido, y no solo células hematopoyéticas. Potencialmente con este hallazgo, todas las líneas celulares podrían ser regeneradas (neuronas, mioblastos, condrocitos, osteocitos...) (Zhao & Mazzone, 2006).

Dentro de las células madre se distinguen las células madre adultas o células madre somáticas, las cuales implican que la mayoría de las células de un ser humano adulto pueden ser regeneradas por células indiferenciadas presentes en su propio cuerpo con una capacidad limitada de replicación. Por otro lado, se encuentran las células madre pluripotenciales inducidas, esto implica la obtención de células madre a partir de células diferenciadas en el adulto a través de rutas de activación celulares, que hacen volver a la célula a su estado de pluripotencialidad.

En líneas generales, las células madre se pueden clasificar en 3 grandes grupos:

1. Células madres embrionarias:

Las células madre embrionarias por definición se obtienen de embriones, principalmente de embriones viables de hasta 5 días post-fecundación; si bien pueden obtenerse a través de la transferencia nuclear o introducción de un núcleo somático a un óvulo tras eliminar su núcleo haploide (técnica que forma parte de la clonación somática), o bien por la obtención de óvulos partenogénicos diploides (es decir, un cigoto producido mediante reproducción asexual). Es precisamente por tratarse de embriones humanos potencialmente viables que el uso de estas células implica objeciones éticas, limitándose en la práctica cualquier experimentación o desarrollo técnico relacionado con las mismas.

La elevada pluripotencialidad de estas células permite pensar que puedan potencialmente utilizarse como fuente única para la diferenciación a múltiples líneas presentes en el hueso adulto, incluyendo células osteogénicas, células vasculares, osteoclastos y células nerviosas.

2. Células madre pluripotentes:

Son las obtenidas en laboratorio a través de la activación de ciertos genes relacionados con la pluripotencia celular permitiendo obtenerlas de células somáticas adultas. Estas células se denominan células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). Varios estudios han demostrado que las iPSCs presentan propiedades similares a las células madre embrionarias, aunque su memoria epigenética de la célula adulta que provienen puede influir en el potencial de diferenciación y pluripotencialidad.

Presentan las ventajas éticas de poder obtenerlas de células adultas, pero entre sus inconvenientes están el desarrollo de respuesta inmune y la formación de teratocarcinomas, puesto que las técnicas utilizadas para su obtención pueden activar oncogenes favoreciendo el desarrollo de procesos tumorales.

3. Células madre adultas:

Son la fuente más segura, suponiendo a corto plazo la vía de obtención más viable para su aplicación en la práctica clínica, pese a no presentar el nivel de potencialidad y diferenciación del resto de células madre. La obtención de las células del mismo individuo es una clara ventaja, al evitar el rechazo inmunológico, pudiendo extraerse de sus reservorios específicos, haciendo que su obtención y uso sea menos costoso que los otros tipos. También existe la posibilidad de utilizar la célula sin extraerla de su reservorio, usando mecanismos que activen su diferenciación y migración al tejido diana.

Entre una gran variedad de células madre adultas podemos destacar las:

- Células madre epiteliales: encargadas de regenerar y renovar la piel.
- Células mesenquimales y hematopoyéticas: albergadas en la médula ósea, que pueden generar nuevos vasos sanguíneos, tejido óseo o cartilaginoso, o bien renovar las células sanguíneas.

Hasta los últimos años se han ido identificado nuevos tipos de células madre adultas, ya que en condiciones normales suelen permanecer inactivas o quiescentes, pero pueden activarse en determinadas circunstancias, como es el caso de las células madre del músculo, las células madre cardíacas, o las células madre neurales. Las células madre mesenquimales (MSCs, de sus siglas en inglés) han demostrado su potencial en la regeneración de tejido óseo debido a su diferenciación y formación de hueso durante el proceso de desarrollo óseo. Múltiples estudios han demostrado su uso en la reparación de defectos óseos segmentarios, así como en la elevación de seno maxilar o la fusión de discos espinales.

La posibilidad de implantar células progenitoras óseas en los implantes antes de su colocación ha sido valorada en varios estudios. Las células madre mesenquimales humanas (hMSCs), se encuentran en el ser humano en la médula ósea y en otros tejidos adultos, se han tratado de estudiar su aplicación en la ingeniería de tejidos. A pesar de los horizontes que abren este tipo de células en la ingeniería de tejidos se han encontrado importantes limitaciones a la hora de su aplicación clínica, principalmente la dificultad de su producción a gran escala, considerando la necesidad de procedimientos para su obtención, aislamiento y enriquecimiento.

Las células madre derivadas del tejido adiposo (ADSCs) representan una fuente accesible y abundante de células mesenquimales autólogas. Son conocidas por tener un potencial de diferenciación celular en varias líneas celulares (p.ej, osteogénica, condrogénica, adipogénica, neural , cardiomiocítica y endotelial).

4. Células autólogas y concentrados de factores:

La regeneración de tejidos es el resultado de la interacción entre factores de crecimiento y células. Son múltiples los tipos celulares y señales moleculares involucradas durante el desarrollo óseo, así como en el proceso de reparación ósea.

Las dos principales técnicas que se utilizan dentro de esta categoría son:

- Concentrado de médula ósea

El concentrado de médula ósea (BMACs) se obtiene normalmente de la cresta ilíaca del propio paciente, obteniendo una fuente rica en células madre osteogénicas y factores de crecimiento osteoconductivos, principalmente para reparar y regenerar defectos óseos.

El BMACs contiene una mezcla de células con funciones regenerativas como las MSCs, células progenitoras endoteliales (EPCs), células madre hematopoyéticas (HSCs), plaquetas, linfocitos y granulocitos. Cada uno de estos componentes juega un papel fundamental en la regeneración ósea.

El BMACs ha demostrado ser un método alternativo seguro para promover la reparación ósea, con una efectividad similar a la de los injertos de hueso autólogo (Amini y cols., 2012).

- Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

El plasma rico en plaquetas ha sido utilizado en múltiples campos para la regeneración de hueso. Su fácil obtención del propio paciente, la ausencia de rechazo inmunológico y su bajo coste han hecho que el interés científico en sus usos terapéuticos ha aumentado en los últimos años.

Los preparados descritos son múltiples en función de las casas comerciales. Se ha descrito su uso en el tratamiento de úlceras crónicas, regeneración de tejidos blandos y regeneración ósea, tratamiento de lesiones ortopédicas, medicina estética y en otros múltiples campos. Su uso está guiado a la estimulación y aceleración de los procesos de reparación tisular.

De Peppo y su grupo (de Peppo y cols., 2012) demostraron que las células madre mesenquimales tienen un gran potencial una fuente homogénea e ilimitada de células para la ingeniería ósea. La capacidad de fabricar estructuras metálicas tridimensionales con complejas formas geométricas y propiedades mecánicas customizadas hacen que la posibilidad de la combinación con células madre mesenquimales abra un abanico de opciones inimaginable.

4. MATERIALES POROSOS

4.1. Introducción

Los materiales porosos han supuesto una nueva vía de desarrollo dentro de los biomateriales en los últimos años. La búsqueda de implantes con una menor densidad, una alta permeabilidad, un aumento de la superficie de contacto con el hueso remanente y una baja conductividad térmica, se ha logrado con la utilización de diferentes técnicas.

Las aplicaciones de los materiales porosos han sido múltiples, sobre todo como implantes óseos, aunque también como sistemas de anclaje percutáneos, como inmovilizadores de marcapasos, estabilizadores de rotula, anclaje de tendones y reparación de defectos abdominales (Yuan, Zhou, & Chen, 2017). Pero también en otros campos tecnológicos, no solo biomédicos, como soporte para catalizadores, filtros, aislantes térmicos o aplicaciones en la construcción y la industria aeroespacial (Sargeant y cols., 2008).

Los implantes porosos metálicos poseen una serie de propiedades que no pueden obtenerse con otros materiales. Por ejemplo, la resistencia mecánica, su rigidez, y la capacidad para absorber la energía son mucho mayores que los polímeros porosos. Son buenos conductores térmicos y eléctricos y mantienen su forma a altas temperaturas frente a los polímeros. Al contrario que las cerámicas, los metales porosos tienen la propiedad de deformarse plásticamente y absorber la energía (Lefebvre, Banhart, & Dunand, 2008).

El interés en la fabricación de materiales porosos fue introducida inicialmente por Sosnik en la década de los 40, cuando trato de desarrollar una estructura porosa de aluminio al añadir mercurio durante su fundición (Degischer & Kriszt, 2002).

Su interés ha ido creciendo a lo largo de las últimas décadas, en la figura 25 (Lefebvre y cols., 2008) se observa el número de publicaciones anuales desde el comienzo de la década de los 70. Se puede observar como partiendo de un número muy

bajo de artículos, se produce un crecimiento gradual hasta mediados de la década de los 90, con un crecimiento anual del 20% a partir del año 2000.

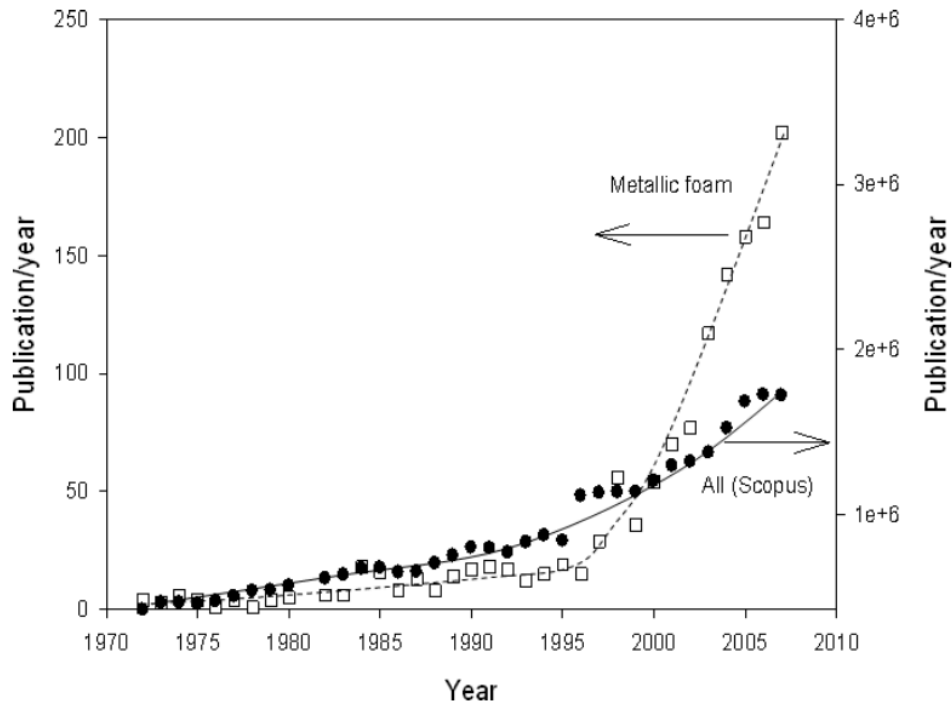


Figura 25: Publicaciones anuales sobre metales porosos en la literatura desde 1970 hasta 2010.

A nivel biomédico las grandes cualidades que presentan los implantes porosos (Sargeant y cols.,2008) son:

- Alta biocompatibilidad, teniendo la capacidad de actuar con una respuesta biológica adecuada en el medio donde son implantados, comparable a los implantes convencionales de titanio, evitando rechazo y encapsulación del implante.
- Combinación de alta resistencia, la cual es importante para prevenir la fractura del dispositivo o para que este se deforme; relativa baja rigidez siendo útil para disminuir los efectos de tensión sobre el hueso colindante y disminuyendo las tasas de resorción ósea perimplantarias; y alta tenacidad entendiéndola como la energía de deformación total que

es capaz de absorber o acumular un material antes de alcanzar la rotura en condiciones de impacto, por acumulación de dislocaciones.

- Mantenimiento de la forma, al no deformarse al soportar las cargas mecánicas a las que son sometidas los huesos donde se implantan.
- Bajo peso, al disminuir la porosidad también disminuye el peso del dispositivo.

La porosidad de los implantes porosos ha sido estudiada para intentar lograr el tamaño adecuado para el crecimiento óseo y vascular en el interior del implante (Boby y cols., 1992). Sargent y cols. en sus estudios definen el tamaño óptimo de los poros para favorecer el crecimiento óseo entre 150 y 400 μm (Sargeant y cols., 2008), aunque se ha demostrado que el hueso puede crecer en poros de menor tamaño, hasta 60 μm , en condiciones donde no soporta cargas (Itälä, Ylänen, Ekholm, Karlsson, & Aro, 2001). Los tamaños son bastante similares en la literatura, Van der Stock (Van der Stock y cols., 2013) en su estudio utiliza como límites un tamaño de poro que varía de las 200 a las 500 μm .

Entre las principales ventajas atribuidas a los implantes porosos no solo se encuentra la mejoría asociada al crecimiento óseo en el interior del dispositivo para mejorar su integración, sino también el menor grado de resorción ósea perimplantaria, asociando una mayor porosidad a una disminución del módulo elástico (Ito y cols., 2014). Cómo se aprecia en la figura 25 del estudio de Ito y cols., se puede observar como a mayor porosidad de los implantes de titanio, más se acerca el módulo elástico al del hueso esponjoso. En la literatura existe una gran evidencia de que a una mayor porosidad el implante presentará un menor módulo elástico. (Crowninshield, 1986; Kohn & Ducheyne, 1990; Manley, Kotzar, Stern, & Wilde, 1987; Yue, Pilliar, & Weatherly, 1984).

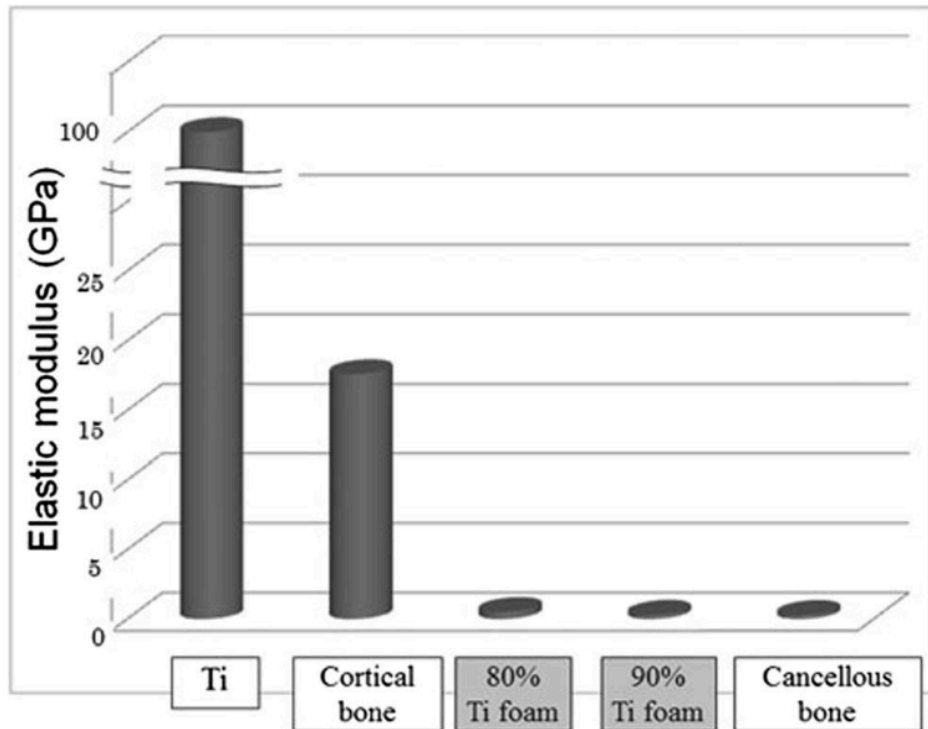


Figura 25: la gráfica muestra el módulo elástico de los implantes estudiados por Ito y cols (Ito, Horiuchi, Arai, Kawahara, & Hongo, 2014).

En su estudio Ito y cols. muestran que los implantes de titanio con una porosidad del 80-90% presentaron un módulo elástico de 0.5 GPa y 0.3GPa, respectivamente. Estos valores son muy cercanos al del hueso medular (0.28 GPa), frente al de los implantes metálicos clásicos (110Gpa en los de Titanio y 230 Gpa en la aleación Cr-Co) (G. Ryan, Pandit, & Apatsidis, 2006). El hueso cortical tiene un módulo elástico entre 10-30 GPa (Robertson, Pierre, & Chahal, 1976; Cameron, Macnab, & Pilliar, 1978; Head, Bauk, & Emerson, 1995). El módulo elástico de los implantes utilizados en la ingeniería de tejidos óseos no debe exceder significativamente al del hueso en el que se implanta, para mantener la correcta estimulación mecánica perimplante, la cual depende de las cargas a las que es sometido (Amini y cols.,2012).

Otra ventaja asociada a los implantes porosos de titanio es el menor artefacto que genera en las pruebas de imagen como el TC o la RMN (Ito y cols.,2014), frente a los implantes clásicos de titanio.

4.2. Técnicas de producción de metales porosos

Existen distintos procedimientos para lograr estructuras porosas (Ryan y cols., 2006). La selección de la técnica de producción se basa generalmente en la aplicación final que va a tener nuestro implante. Dividiremos principalmente en técnicas de celda cerrada y técnicas de celda abierta. Entendemos por técnicas de celda cerrada aquellas en que cada célula se encuentra completamente cubierta por una fina pared o membrana de metal, mientras que en las técnicas de celda abierta las células se encuentran interconectadas, permitiendo al tejido penetrar en el implante.

Tabla 8: Métodos de manufactura aditiva en metales.

Métodos de Fabricación			
Celda cerrada		Celda abierta	
Distribución aleatoria	Distribución gradual del poro	No homogéneo	Homogéneo
Espumado directo	Plasma Spraying	Sinterización polvos metálicos	Técnicas de prototipado rápido
		Sinterización fibras metálicas	
		Espaciadores de sacrificio	
		Réplica	
		Síntesis por combustión	

Las técnicas de celda cerrada proveen materiales con buenas propiedades mecánicas, pero que no permiten el acceso a su interior, por este motivo son usados en aplicaciones donde deben soportar cargas. Al contrario que los anteriores, los materiales producidos por técnicas de celda abierta son usados en aquellas aplicaciones donde prima la función (Lefebvre et al., 2008). En la tabla 8 podemos observar un resumen de los diferentes métodos de fabricación de implantes metálicos porosos.

En nuestro caso nos centraremos en describir las técnicas de celda abierta, ya que la técnica utilizada en esta tesis para desarrollar los implantes se encuentra dentro de este grupo.

Técnicas de celda abierta:

A. Sinterización de polvos metálicos

La sinterización es una de las técnicas más utilizadas para la fabricación de implantes porosos. La sinterización consiste en el tratamiento térmico de polvos de metal para lograr la unión de las partículas de polvo entre sí a altas temperaturas sin alterar en gran medida la forma de la partícula, evitando que se fundan para lograr una estructura porosa homogénea. La temperatura utilizada en la sinterización siempre es inferior que el punto de fusión del principal metal de la aleación.

El volumen de fracción de porosidad con esta técnica está asociado con el grado de unión entre las partículas y con el tamaño de estas. Las variables pueden ser controladas controlando el tamaño y forma de las partículas de polvo, la temperatura a la que son sometidas y el tiempo de sinterización. Las limitaciones de esta técnica es que el tamaño y forma del poro está marcado por el tamaño y forma del polvo que se utiliza. Con esta técnica, utilizando partículas de polvo esféricas, se pueden lograr implantes con una porosidad limitada al 50% (Degischer & Kriszt, 2002).

El tamaño del poro, el volumen de fracción, la morfología y el tamaño del cuello entre partículas tienen un impacto relevante en las propiedades mecánicas del implante

resultante. Por norma general, los implantes desarrollados por sinterización de polvos metálicos son muy frágiles, tendiendo a fracturarse las uniones entre partículas cuando son sometidos a cargas.

B. Espaciadores de Sacrificio

La técnica de espaciadores de sacrificio es un proceso de fabricación capaz de producir implantes metálicos de gran porosidad. La técnica de espaciadores de sacrificio ha sido muy utilizada en el procesado de cerámicas porosas, utilizando estos espaciadores como agentes formadores de poro unidos a los materiales cerámicos para posteriormente evaporarse o quemarse durante el proceso de sinterización, dejando los poros donde antes se encontraba el espaciador (Studart, Gonzenbach, Tervoort, & Gauckler, 2006). Entre estos agentes se encuentran el grafito, el ácido salicílico, el cloruro de sodio, el carbón, el algodón, la celulosa o la parafina.

El proceso comienza con la mezcla de los polvos metálicos con el material mantenedor de espacio. Esta mezcla es sometida a un tratamiento a baja temperatura para eliminar el agente mantenedor de espacio, permitiendo simultáneamente una fase inicial de sinterización entre las partículas de metal que están en contacto. El resultado es la formación de un cuello inicial entre las partículas. La continuación de la sinterización a altas temperaturas aumenta la unión entre las partículas, aumentando la densidad del implante y asociando una mejora de la integridad estructural. En la figura 26 podemos observar un esquema de la técnica de espaciadores de sacrificio.

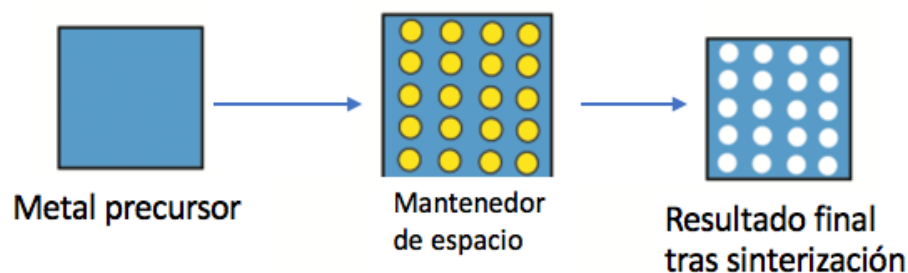


Figura 26: esquema de la técnica de espaciadores de sacrificio.

Durante la preparación, el tamaño de las partículas de polvo del metal debe ser menor que el tamaño promedio del polvo del espaciador (G. E. Ryan, Pandit, & Apatsidis, 2008). También debe conseguirse una presión suficiente para que la estructura mantenga su forma geométrica durante el proceso de conformado.

Los productos orgánicos se eliminarán por pirolisis a altas temperaturas (200-600 °C), siendo una de las principales desventajas de esta técnica al precisar tiempos largos para el tratamiento térmico de la misma. Esto se puede paliar con la utilización como sacrificadores de espacio de líquidos, como el agua o aceites, los cuales pueden ser evaporados en tiempos más cortos y sin generar gases tóxicos (Studart y cols., 2006). Los materiales de sacrificio tales como sales, partículas cerámicas y metálicas son normalmente extraídos a partir de medios químicos. La eliminación de las sales se produce de una forma muy sencilla y fácil, ya que solo es necesario el lavado en agua de forma repetitiva.

Con esta técnica es posible lograr implantes con porosidades del 60-80% (Bram, Stiller, Buchkremer, Stöver, & Baur, 2000). Eligiendo el tamaño, forma y cantidad de espaciador que se va a utilizar se pueden ajustar las propiedades mecánicas del implante.

C. Réplicas o exo-plantillas

Se trata de una técnica de fabricación que se basa en la distribución del material alrededor de un molde preformado o plantilla sintética. Estas plantillas se impregnan en la suspensión del material y posteriormente son pirolizadas a temperaturas entre 300-800 °C para eliminar la plantilla (Figura 27). Varias estructuras celulares pueden ser utilizadas como plantillas tanto naturales como sintéticas.

Se considera la primera técnica utilizada para el desarrollo de cerámicas porosas y desde entonces el método más empleado para el desarrollo de estructuras metálicas porosas. Schwartzwalder y Somers desarrollan la técnica utilizando polímeros como moldes para la fabricación de cerámicas esponjas. Desde entonces la técnica de réplica

ha ganado popularidad como método de fabricación de cerámicas macroporosas, siendo muy amplio su uso en la fabricación de filtros y otras aplicaciones.

Esta técnica presenta una gran flexibilidad, debido a que puede aplicarse en cualquier material que pueda ser disperso en una solución. Recientemente se ha utilizado también para estructuras porosas de titanio, logrando materiales con porosidades del 40-95% (Molero y cols., 2016).

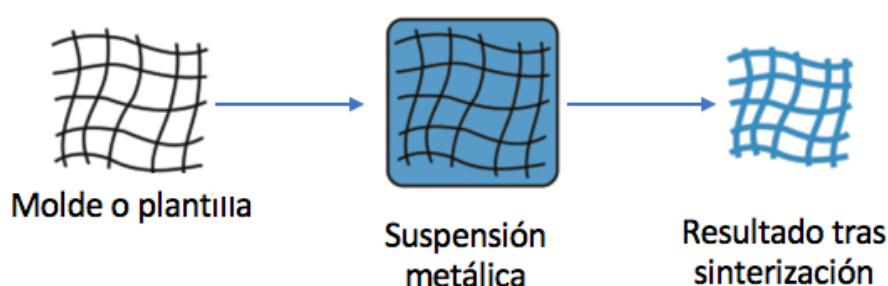


Figura 27: Esquema de la técnica de Réplicas o Exo-plantillas.

D. Síntesis por autopropropagación o síntesis por combustión

La síntesis por autopropropagación o síntesis por combustión es un método de fabricación desarrollado por Merzhanov en 1967 para la síntesis de boruro de titanio. Se trata de una técnica bastante sencilla, rápida y económica. Principalmente ha sido utilizado para el desarrollo de estructuras porosas de aleación Ni-Ti. La síntesis por combustión se obtiene a través de una reacción exotérmica auto sostenida extremadamente rápida impulsada por el gran calor liberado en la síntesis.

Esta se obtiene de una alta exotermicidad de una reacción iniciada entre ambos metales, esta reacción puede ser obtenida de dos formas: a través de una explosión térmica en la cual los reactantes van siendo calentados gradualmente por una fuente externa o a través de una reacción autopropropagativa sin requerir energía adicional.

Varios factores influyen en la microestructura y porosidad final de las muestras como son el tamaño de las partículas de los reactantes, el aglutinante utilizado o la presión a la que se compactan. El control de estos parámetros permite controlar las propiedades mecánicas de la muestra. En la figura 28 podemos observar un esquema del proceso de este método de fabricación (G. E. Ryan y cols., 2008).

Una ventaja de este proceso de fabricación es la alta pureza de los implantes resultantes debido principalmente a la eliminación de las impurezas durante el procesamiento a alta temperatura de la muestra (X Zhang, Ayers, Thorne, Moore, & Schowengerdt, 2001).

Li y cols. desarrolló implantes microporosos de NiTi con una porosidad final del 54% (B. Li, Rong, Li, & Gjunter, 2000).

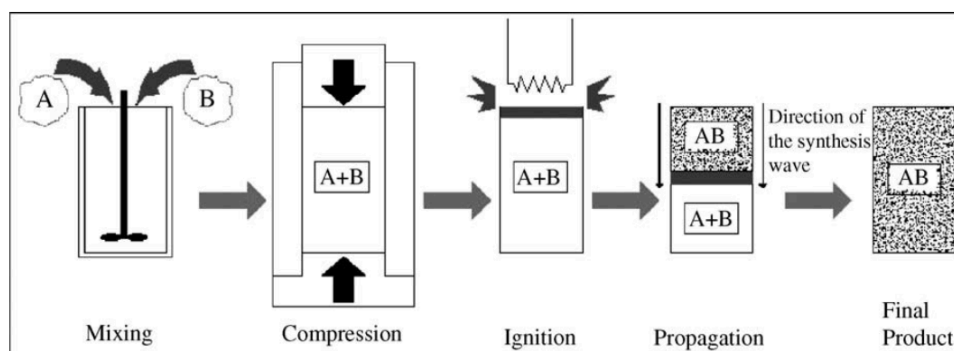


Figura 28: esquema del proceso de síntesis por autopropagación (G. E. Ryan y cols., 2008).

E. Técnicas de manufactura aditiva

Las técnicas de manufactura aditiva engloban a aquellos procedimientos capaces de crear objetos tridimensionales mediante la adición de una capa tras otra de material para construir objetos físicos.

La fabricación aditiva es un término que abarca a muchas otras tecnologías de Prototipado Rápido (RP), manufactura digital (DDM), fabricación de capas y fabricación aditiva. La fabricación aditiva se define en la norma UNE-EN ISO/ASTM

52900:2017 como “el proceso de unión de materiales para fabricar piezas u objetos a partir de datos de modelos 3D, generalmente capa a capa, en oposición a métodos de fabricación mediante eliminación de material y de conformado”. Esta norma clasifica los procesos de manufactura aditiva en siete categorías:

1. Proyección de aglutinante (*Binder Jetting*). proceso en el que un agente líquido aglutinante se deposita selectivamente para unir materiales en polvo.
2. Deposición de energía focalizada (*Directed energy deposition*): proceso en el que se utiliza energía térmica focalizada (láser, haz de electrones o arco de plasma) para unir materiales mediante fusión, a medida que se depositan.
3. Extrusión de material (*Material extrusion*): proceso en el cual el material se dispensa selectivamente a través de una boquilla o un orificio.
4. Proyección de material (*Material jetting*): proceso en el cual se depositan selectivamente gotas del material de fabricación. Ej. Fotopolímeros y ceras.
5. Fusión de lecho de polvo (*Powder bed fusion*): proceso en el cual la energía térmica funde selectivamente ciertas zonas de un lecho de polvo.
6. Laminado de hojas (*Sheet lamination*): proceso en el cual el material en forma de laminas u hojas se une para formar un objeto.
7. Fotopolimerización en tanque o cuba (*vat photopolymerization*): proceso en el que el fotopolímero líquido se cura selectivamente en una cuba mediante polimerización activada por luz.

Las limitaciones con las que cuentan las anteriores técnicas de desarrollo de materiales porosos, previas a la manufactura aditiva, se encuentran ligadas a la dificultad para precisar la porosidad que se desea, dándose una gran heterogeneidad en el proceso de fabricación, teniendo una gran variabilidad en los resultados que

presentan. Frente a estas limitaciones, la irrupción de las técnicas de manufactura aditiva ha permitido la fabricación de estructuras tridimensionales con una porosidad determinada, eliminando la variabilidad y consiguiendo una mejor predictibilidad de la respuesta mecánica de las mismas (Xiaoying Zhang & Zhang, 2015).

Si bien la tecnología se introdujo por primera vez en la década de 1980, sus primeros usos se centraron en la creación de prototipos y para la previsualización de los modelos de producción masiva antes de la realización de un molde final. Desde entonces, la fabricación aditiva ha evolucionado y se está utilizando para crear productos de uso final en todas las industrias. Los productos creados con tecnologías de manufactura aditiva se pueden desarrollar con una amplia variedad de materiales (plásticos, metales, cerámica...).

La idea de las técnicas de impresión tridimensional aparece en la década de los setenta cuando Pierre A.L. Ciraud (Jamróz, Szafraniec, Kurek, & Jachowicz, 2018) describe un método para la aplicación de material en polvo y su posterior solidificación capa a capa con la acción de un gran haz de energía. A principio de la década de los ochenta Carl Deckard desarrolla la sinterización selectiva con laser.

La primera técnica comercialmente disponible se trata de la Estereolitografía (SLA), desarrollado por Chuck Hull. Este método se basa en la polimerización de resinas líquidas a través de rayos ultravioletas. A finales de los años ochenta, Scott Crump patenta el Moldeo por deposición de fundidos (FDM), una técnica que utiliza materiales termoplásticos para la preparación de objetos. En la década de los noventa, Emanuel Sachs desarrolla las técnicas de impresión tridimensional.

En la figura 29 podemos observar los grandes avances en la impresión 3D en su aplicación en medicina y farmacia (Jamróz y cols., 2018).

Las técnicas de manufactura aditiva tienen aplicación en las industrias aeroespacial, energética, biomédica, automoción y transporte, entre otras. Sin embargo, actualmente, solo unas pocas aleaciones metálicas pueden producirse de forma fiable mediante técnicas de manufactura aditiva, siendo las más relevantes Ti6Al4V, CoCr, Inconel 718 y AlSi10Mg. La mayoría de las aleaciones en uso no pueden fabricarse por manufactura aditiva debido a que la fusión y solidificación durante el proceso de manufactura aditiva

conducen a microestructuras inaceptables, con grandes granos columnares, anisotropía, porosidad, grietas y propiedades finales indeseadas. También existen problemas con el procesado por manufactura aditiva de materiales compuestos metal-cerámico, debido al diferente comportamiento de los polvos a la fuente de calor, la segregación o la descomposición de las fases cerámicas.

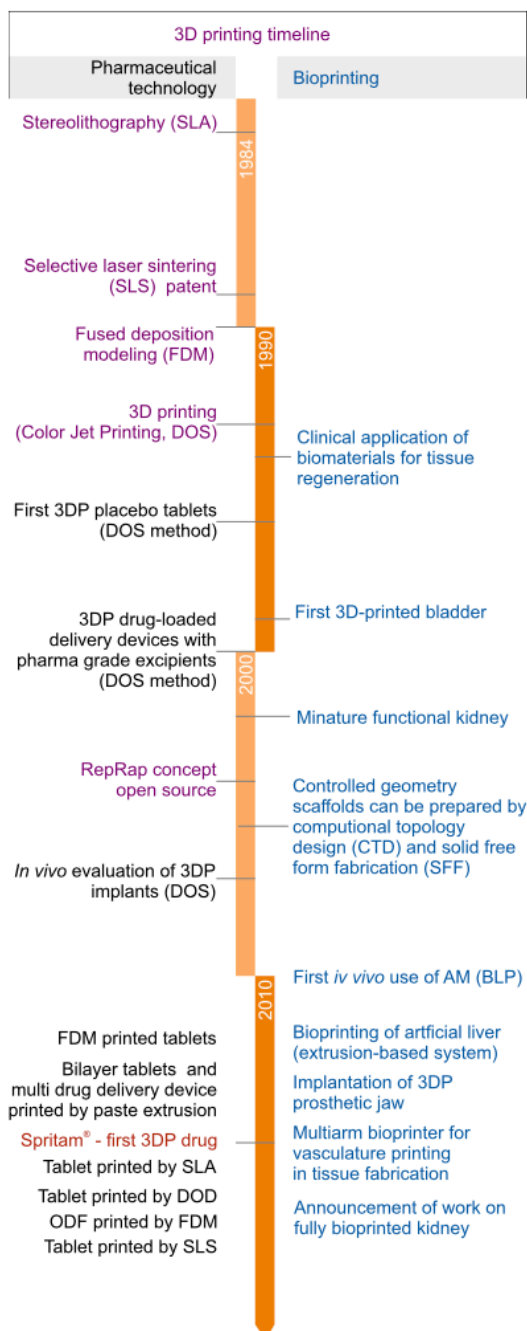


Figura 29: grandes hitos de la impresión 3D en su aplicación a la medicina y la farmacia. (Jamróz y cols., 2018).

El factor determinante para cada proceso es la técnica utilizada para aportar los materiales. Esto determina, por ejemplo, qué tipos de materiales se pueden utilizar en el proceso, ya que materiales diferentes tienen distintos principios de fusión o adhesión. Básicamente para el proceso de fabricación aditiva las propiedades fundamentales de los productos dependen de:

1. Tipo de material: polímero, metal, cerámica o compuesto.
2. El principio aplicado para la fusión o adhesión: fusión, curado, sinterizado, etc.
3. La materia prima que se utiliza: líquido, polvo, suspensión, filamento, lámina, etc.
4. Como se une el material, es decir, la arquitectura de la máquina.

El principio fundamental de los procesos de manufactura aditiva es la formación de piezas mediante la sucesiva adición de material. Dependiendo del proceso, las piezas pueden adquirir la geometría y propiedades básicas en un solo paso (proceso de una sola etapa) o requerir un proceso secundario (proceso de varias etapas), como una etapa de sinterización o HIP (compactación isostática en caliente). En algunas clasificaciones los métodos de una etapa se consideran métodos directos y los de varias etapas, métodos o procesos indirectos. Esta técnica normalmente se realiza en cinco pasos (Narayan y cols., 2014). La fabricación aditiva comienza con un archivo de diseño asistido por ordenador (CAD) creado u obtenido de alguna entidad física, que se utiliza como modelo para crear productos. Este archivo es convertido a formato STL. En un tercer paso este archivo se preprocesa, para posteriormente comenzar a recrear el archivo mediante capas muy finas (medidas en micras o milímetros), de material para construir el objeto 3D final. En un quinto paso, se puede finalizar la estructura realizando un tratamiento de superficies dependiendo de la técnica y la finalidad de la estructura.

De entre las técnicas disponibles, las más ampliamente utilizadas para metales son las que parten de material en polvo o en forma de filamento, con o sin el uso de un ligante. Las tecnologías de una sola etapa para metales utilizan la fusión como método de unión entre capas, y son básicamente “Deposición de energía focalizada” y “Fusión de lecho de polvo”. Las tecnologías de varias etapas utilizan principalmente la adhesión

como técnica de unión entre capas y requieren para ello el uso de un ligante o la deposición de una suspensión o pasta. Se encuadran en estas técnicas las de “Proyección de aglutinante” y “Extrusión de material”. En estos casos se obtiene una pieza “en verde” que hay que someter a procesos posteriores de eliminación de ligante y sinterización. Los métodos de procesamiento más empleados, especialmente en metales, en la manufactura aditiva de fusión de polvo se resumen en la tabla 9.

Tabla 9: Métodos de manufactura aditiva en metales.

Categoría en la norma	Método	Materia prima	Tipo de proceso
Deposición de energía focalizada (Directed energy deposition)	Laser Metal Deposition (LMD) o Direct Metal Deposition (DMD) Wire arc additive manuf (WAAM) o Wire fed laser beam (WFLB)	Polvo Filamento metálico	Directo (una etapa)
Fusión de lecho de polvo (Powder bed fusión)	Laser Beam Melting (LBM) ó Selective Laser Melting (SLM) Electron Beam Melting (EBM)	Polvo	Directo (una etapa)
Proyección de aglutinante (Binder Jetting)	Selective Laser Sintering (SLS) o 3D printing (3DP)	Polvo	Indirecto (varias etapas)
Extrusión de material (Material extrusión)	Fused Deposition Modeling (FDM) o Fused Filament Fabrication (FFF) Robocasting	Filamento metal-polímero Suspensiones	Indirecto (varias etapas)

Los procesos de proyección de material (Material jetting) incluyen la denominada impresión de tintas o Inkjet printing (Franchin, Wahl, & Colombo, 2017), y se han utilizado para cerámicos pero rara vez para metales. De igual manera, los procesos de fotopolimerización en tanque o cuba (SLA) también se han utilizado para cerámicos a partir de suspensiones fotocurables cargadas con partículas cerámicas (Hernández-Rodríguez y cols., 2014; Travitzky y cols., 2014).

La diferencia fundamental entre los métodos directos estriba en el tipo de fuente de calor (haz de electrones en EBM y láser en SLM o LMD) y la manera de depositar el metal en polvo (en LMD el polvo se aporta localmente mediante una boquilla coaxial o lateral, mientras que en SLM la pieza se construye a partir de un lecho de polvo). El proceso LMD permite construir paredes finas y reparar piezas porque puede aplicar el haz sobre un sustrato. En todo caso, la fuente de calor funde el metal, que es sometido a

complejos procesos térmicos (Frazier, 2014), que incluyen fusión y solidificación repetidas, de manera análoga a lo que ocurre en procesos de soldadura por fusión. Estas técnicas no han dado buenos resultados para materiales compuestos debido a las diferentes características de los componentes y, en ocasiones, a la evaporación selectiva de los mismos.

En los métodos indirectos se utiliza un ligante o aglutinante para unir las capas de material. La diferencia radica en la manera de aplicar el ligante: en los métodos de SLS o 3DP se deposita una capa de ligante sobre la capa de polvo repetidamente hasta construir la pieza. En los métodos de extrusión de material se utiliza un filamento de polímero cargado con partículas del metal, o bien se hace pasar una suspensión a través de una boquilla. Estos métodos se han utilizado con éxito para la fabricación de cerámicos (Kruth, Vleugels, Deckers, & Shahzad, 2012) y compuestos (Snelling, Williams, Suchicital, & Druschitz, 2017) o metal duro (Scheithauer y cols., 2017).

El impacto de las técnicas de manufactura aditiva en el campo biomédico ha sufrido una importante expansión desde la creación de la impresión 3D en los ochenta. El motivo es la posibilidad de poder desarrollar objetos de una arquitectura y funcionalidad exclusiva, permitiendo el desarrollo de implantes específicos para la anatomía de cada persona, el desarrollo de fantasmas para la formación sanitaria, así como para la mejora de las planificaciones preoperatorias (De Peppo y cols., 2012).

Entre los múltiples usos que se están ya implementando en medicina, se encuentran:

A. La fabricación de apósitos para heridas

La creciente demanda para desarrollar dispositivos a medida de las personas ha sido uno de los principales estímulos para la evolución de las técnicas de manufactura aditiva y su uso en la medicina. La disponibilidad de nanopartículas antibacterianas y factores que mejoran la curación de las heridas son retos que plantea esta tecnología, aunque su aplicación industrial aún no esté generalizada.

El desarrollo de apósitos para heridas customizados de policoprolactona con cinc, cobre y plata fue descrito por Muwaffak (Muwaffak y cols., 2017). El filamento metálico fue obtenido por extrusión depositándose sobre moldes de la nariz del paciente (figura 30). El apósito mostró una liberación prolongada de los metales y mantuvo sus propiedades bactericidas.

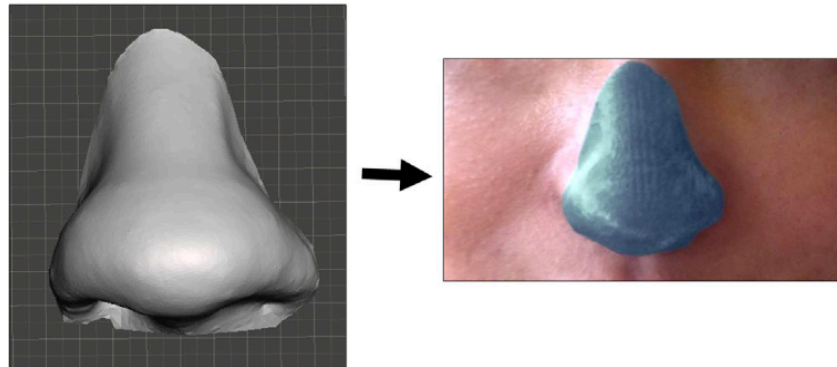


Figura 30: Modelo 3D de la nariz del paciente, a la derecha el apósito impreso de Cu-PCL. (Muwaffak y cols., 2017)

B. Implantes y prótesis

La fabricación de implantes y prótesis mediante técnicas de manufactura aditiva ha revolucionado la medicina personalizada. Las técnicas de impresión 3D permiten desarrollar estructuras ajustas a la anatomía y funciones de cada persona, customizando el tratamiento. Estos dispositivos permiten rehabilitar no solo la función y la movilidad, sino también la apariencia perdida por traumatismos o deformidades.

En la figura 31 se muestra un implante a medida desarrollado por SLM de la casa KLS Martin para la reconstrucción de defectos orbitarios tras un traumatismo facial que ha conllevado una fractura a dicho nivel.

A nivel craneofacial estas técnicas han permitido el desarrollo de implantes customizados específicos para reconstrucción de defectos, tanto a nivel craneal con implantes de PEEK o titanio, como a nivel de defectos maxilares, mandibular y

orbitarios.



Figura 31: implante a medida desarrollado por SLM de la casa KLS Martin.

C. Modelos para planificación quirúrgica, entrenamiento y fantasmas:

Los fantasmas médicos se tratan de estructuras altamente demandadas para el diagnóstico y tratamiento de múltiples enfermedades. El uso de las técnicas de manufactura aditiva permite a través de los modelos obtener un diagnóstico más certero, mejorar la evaluación de los cambios patológicos, así como la visualización de la anatomía específica del paciente. La planificación preoperatoria aumenta notablemente la información específica lo cual reduce las complicaciones.

La impresión 3D permite la planificación preoperatoria de la resección de un tumor. En la figura 32 se aprecia el caso de un ameloblastoma mandibular tratado por el servicio de cirugía maxilofacial del Hospital Universitario 12 de Octubre, donde se realizó una planificación tridimensional de la resección necesaria, para posteriormente imprimir por SLA un modelo con guías de corte a nivel de la mandíbula y del peroné con el que se reconstruyó el defecto óseo.

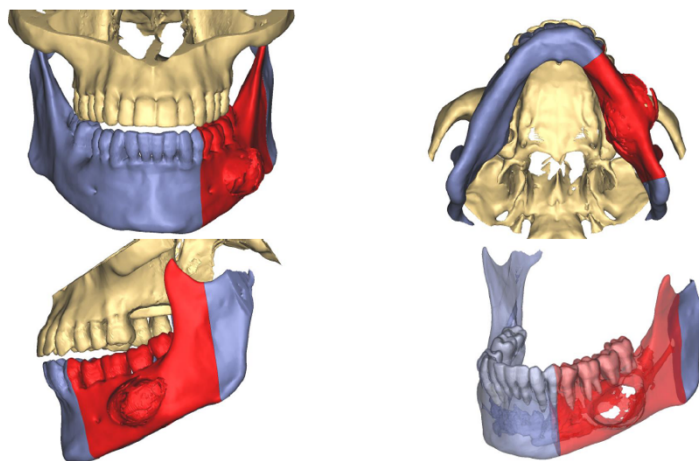


Figura 32: planificación preoperatoria de un ameloblastoma mandibular.

A continuación, desarrollaremos más ampliamente las distintas técnicas de manufactura aditiva:

1. Estereo-Litografía (Stereo-lithography (SL))

Considerada la primera técnica de fabricación aditiva. El término “estereolitografía” fue acuñado por Chuck Hull patentado en 1986 (Hills, Dennis, Park, & Wayne, 1993). Como la mayoría de las técnicas de manufactura aditiva, la estereolitografía se basa en la fabricación de estructuras a través de un diseño CAD (computer-aided design). Se trata de un proceso de fabricación que generalmente consiste en el control de la solidificación de resinas por fotopolimerización, y que posteriormente curan en un tanque mediante luz ultravioleta para construir objetos tridimensionales.

Estos objetos son obtenidos mediante la adición de finas capas, impresas una encima de otra (Melchels, Feijen, & Grijpma, 2010). Cada capa es una sección transversal del objeto que bien a través de un proyector de luz o un laser controlado por ordenador (Figura 33), se ilumina parcialmente la superficie de la resina, que es el material consumible, continuado con la solidificación de las áreas sometidas a fotopolimerización, mientras que las zonas periféricas de la resina que no han sido tratadas permanecen líquidas, tras finalizar este paso se pasa a la siguiente capa y de esta forma se va creando, capa a capa una pieza tridimensional (Degischer & Kriszt, 2002). Una vez que la pieza tridimensional se ha completado, ésta se sumerge en un

baño químico que retira el exceso de resina y, posteriormente, es tratada térmicamente en un horno de luz ultravioleta.

Esta tecnología se basa en la realización de prototipos en resina, aunque es posible fabricar andamiajes cerámicos embebiendo polvo cerámico en la matriz polimérica. Los materiales obtenidos por esta tecnología presentan limitaciones debido al sobrecurado de la luz solar y la baja resistencia térmica de las resinas.

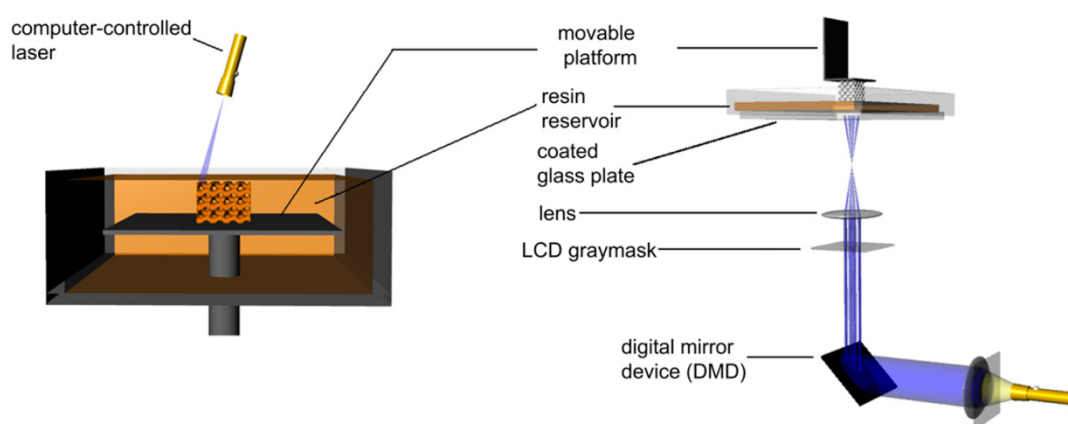


Figura 33: esquema de los procesos de esterolitografía. Izquierda: de abajo arriba con escaneado láser. Derecha: de arriba-abajo con proyección de luz. (Melchels y cols., 2010)

Entre las ventajas de la SLA se encuentra su alta resolución. Su precisión puede alcanzar las 20 μm (Melchels y cols., 2010). Otra de sus principales ventajas es su rapidez, consiguiendo poder tener los objetos funcionales en menos de un día (Lee, Kim, & Cho, 2010).

Las posibilidades que ofrece la estérolitografía en biomedicina son múltiples, aunque a pesar de ello, su uso aún no está muy extendido. La posibilidad de utilizar archivos de técnicas de imagen utilizadas en la práctica clínica diaria como son el Tomografía Computarizada (TC) o la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) hace que esta técnica sea especialmente útil. Con estas imágenes y las técnicas actuales nos permiten fabricar modelos customizados de los pacientes, favoreciendo nuestra planificación preoperatoria, disminuyendo el tiempo quirúrgico y disminuyendo la

morbilidad asociada a la cirugía (Sarment, Al-Shammari, & Kazor, 2003). En la imagen 34 podemos observar una modelo de una mandíbula completa desarrollada por SLA que sirve para el moldeo prequirúrgico de la placa de reconstrucción que va a utilizarse en la cirugía, disminuyendo el tiempo quirúrgico y mejorando los resultados postoperatorios.



Figura 34: Modelo de mandíbula completa desarrollado por SLA.

En implantología, el uso de guías de fresado permite una importante mejoría respecto a las guías quirúrgicas clásicas utilizadas en cirugía oral (Valente, Schirotti, & Sbrana, 2009). En la figura 35 podemos apreciar el diseño 3D de una férula quirúrgica para un caso complejo en un paciente con antecedente de displasia ectodérmica para la rehabilitación implantológica de todo el maxilar superior y la arcada inferior tratado en la sección infantil de cirugía maxilofacial del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Aparte de la fabricación de modelos quirúrgicos, SLA puede ser utilizado para la fabricación de implantes específicos, por ejemplo, en casos de trauma facial se puede realizar una imagen en espejo del lado no afectado para diseñar un dispositivo. La principal desventaja es la escasa biocompatibilidad de las resinas utilizadas en esta técnica. Los materiales usados son principalmente derivados del PPF (Polipropileno Fumarato), Carbonato de Trimetileno o gelatinas (Lee y cols., 2010). Aunque esta técnica no ha sido aún utilizada en ingeniería de tejidos óseos, tiene un gran potencial.

Cabe resaltar que no se utiliza para la fabricación de implantes o prótesis metálicas.

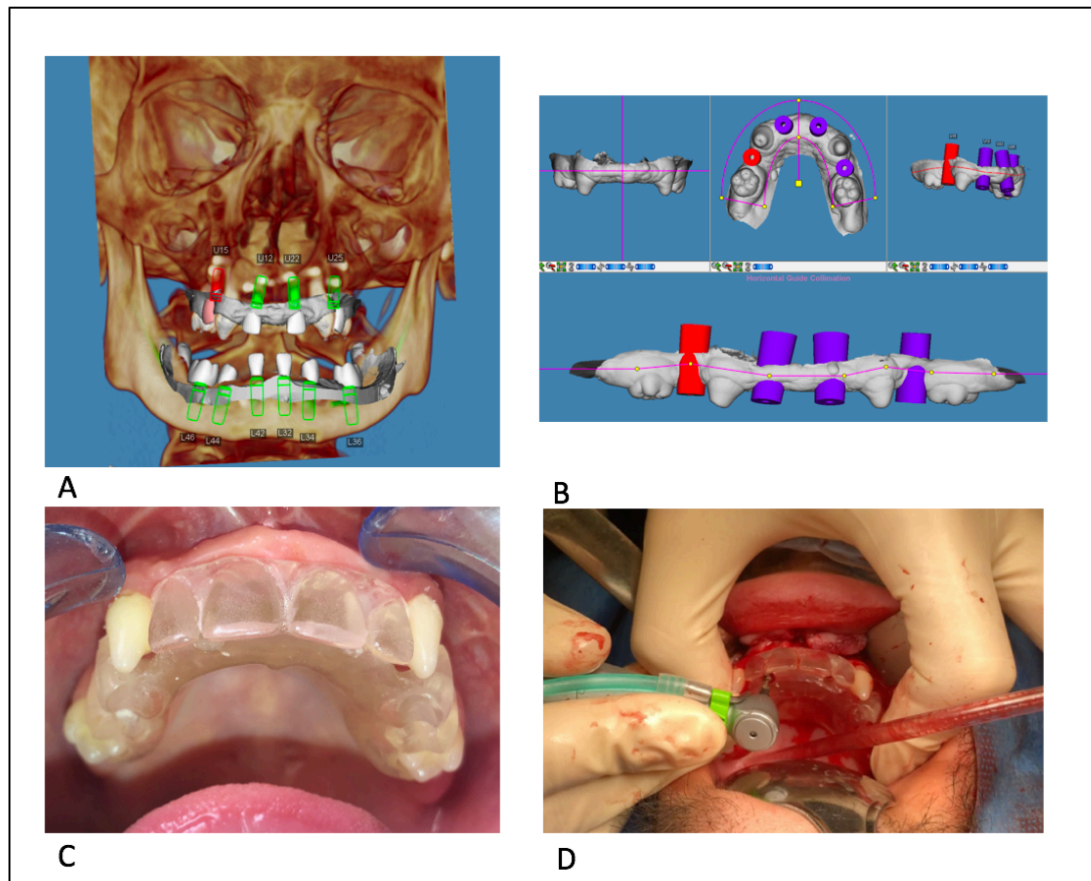


Figura 35: A. Planificación tridimensional de la rehabilitación implantológica en paciente con antecedente de displasia ectodérmica. B: Diseño de la férula quirúrgica con el software Dolphin 3D. C: Férula quirúrgica el día de la cirugía. D: Fresado a través de la guía quirúrgica.

2. Sinterización selectiva por Laser (Selective Laser Sintering (SLS))

La SLS fue creada y patentada en 1979 por Carl Deckard y Joe Beaman en la Universidad de Texas (Chia & Wu, 2015).

Comparado con otros métodos de fabricación por adición, el SLS puede producir piezas a partir de un rango relativamente amplio de materiales de polvo. Estos

incluyen polímeros como el nailon (puro, con fibras de vidrio u otras fibras), o poliestireno, metales que incluyen acero, titanio, aleaciones y compuestos.

El proceso puede conllevar un fundido completo, parcial o sinterizado en fase líquida. Dependiendo del material se pueden conseguir piezas con densidades del 100% de la densidad del material, teniendo así la pieza propiedades físicas comparables a aquellas fabricadas por métodos tradicionales.

La tecnología SLS se está expandiendo por todo el mundo debido a la facilidad que tiene para la fabricación de piezas de geometría muy compleja directamente de los modelos digitales CAD, y la posibilidad de utilizar implantes desarrollados por esta técnica para reparar huesos con carga soportada (Warnke y cols., 2009).

Es una técnica de adición de prototipado rápido en el cual se deposita una capa de polvo, de unas décimas de milímetro, con un aglutinante o “binder” en una cuba que se ha calentado a una temperatura ligeramente inferior al punto de fusión del polvo. Seguidamente un láser CO2 funde el aglutinante en los puntos seleccionados (causando que las partículas se fusionen y solidifiquen). El láser sinteriza cada capa con gran precisión siguiendo un diseño computarizado. El proceso es así repetido tantas veces como capas se necesiten fundir hasta crear el objeto tridimensional (Figura 36). Posteriormente es necesario un proceso secundario para eliminar el aglutinante y sinterizar.

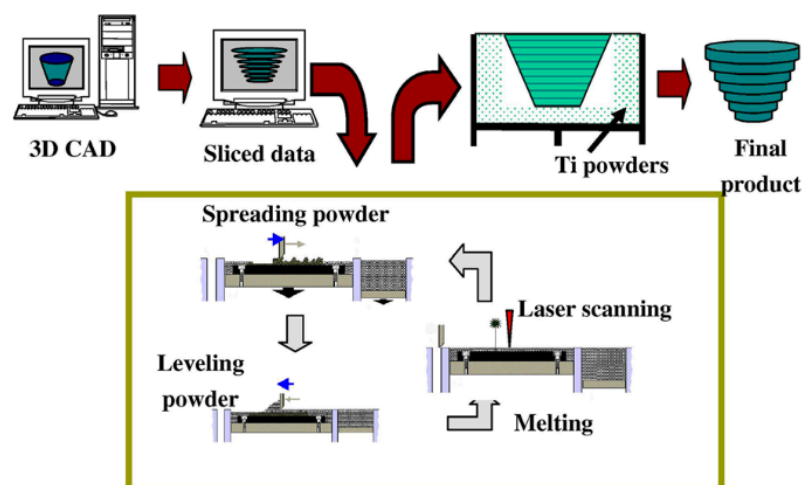


Figura 36: Esquema SLS: la sinterización láser utilizar un haz láser para unir las partículas de polvo y crear la estructura 3D. (Pattanayak et al., 2011)

Una de las principales ventajas de esta técnica es su capacidad para fabricar directamente implantes metálicos que puedan ser utilizado para reparar huesos con cargas soportadas (Cheng y cols., 2017). Las características de estos dispositivos dependerán del tamaño del polvo metálico utilizado, el diámetro del rayo laser y la transferencia de calor en el depósito de polvo (Chia & Wu, 2015).

Esta técnica también ha sido descrita para la fabricación de estructuras anatómicas customizadas. La integración del diseño por ordenador y la fabricación con SLS han permitido la creación de dispositivos con una arquitectura específica externas y una estructura interior con porosidad.

3. Impresión en 3D (3D printing (3D-P))

Los principios de la impresión 3D son muy similares a los de SLS pero prescindiendo del laser CO2. Este sistema se patentó en el MIT en 1995 desarrollado por Sachs y cols.

En él un lecho de polvo se esparce sobre un pistón sobre el que posteriormente un cabezal de inyección proyecta gotas de aglomerante donde se requiere la solidificación de la capa. Cuando se ha conformado una de las capas, el pistón baja y un nuevo lecho de polvo se esparce sobre el cual, el aglomerante es proyectado por la cabeza de impresión, creando de ese modo la estructura en 3D. La estructura aglutinada que queda es tratada térmicamente para crear uniones entre las partículas de polvo y dar consistencia a la estructura fabricada (Figura 37).

La densidad del empaquetado, la humedad de la suspensión, el grosor de las capas, el volumen de las gotas y la saturación del aglutinante son variables que influyen en el resultado final del producto (Bose, Vahabzadeh, & Bandyopadhyay, 2013).

El principal inconveniente de este proceso es la baja resolución vertical que presenta el compacto, por lo que el producto final suele presentar baja resistencia biomecánica, lo cual requiere un proceso de sinterización a alta temperatura para lograr estructuras aptas para utilizar en ingeniería ósea (Yuan y cols., 2017).

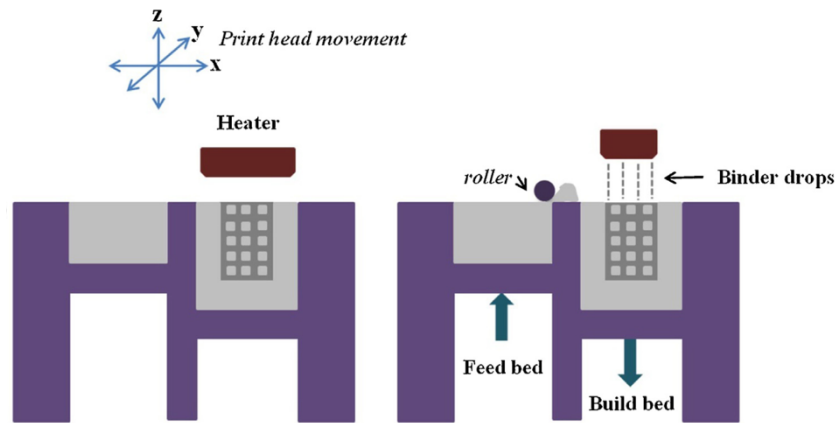


Figura 37: esquema del método de impresión en 3D.

4. Fusión por haz de electrones o Electron Beam Melting (EBM) y Fusión selectiva por Laser o Selective Laser Melting (SLM)

Se tratan de técnicas de manufactura aditiva e impresión 3D, que funden polvos metálicos de varias aleaciones, incluyendo las de Titanio.

En la técnica de EBM el metal es depositado en vacío fusionándolo con el calor desprendido del haz de electrones, mientras que en SLM utiliza un laser como fuente de calor. Estas técnicas difieren de SLS en que el material previo a su fusión es fundido completamente.

El proceso de fusión selectiva por láser (SLM) se lleva a cabo dentro de una cámara que contiene una atmósfera fuertemente controlada de gas inerte (por ejemplo argón o nitrógeno con los niveles de oxígeno por debajo de 500 partes por millón). La energía láser es lo suficientemente potente como para permitir la fusión completa (soldadura) de las partículas hasta formar el metal sólido. El proceso se repite capa tras capa hasta que la pieza es completada (Figura 38).

Esta tecnología está ampliamente implicada en el desarrollo de aleaciones de Titanio, la cual la hace una gran opción para el desarrollo de implantes utilizados en Medicina (Amin Yavari y cols., 2014). Con esta técnica se pueden desarrollar complejas

estructuras tridimensionales con una porosidad de hasta 200 μm (Hoffmann y cols., 2014),

La EBM permite a través de un diseño digital (CAD) el desarrollo de implantes customizados, específicos para cada paciente utilizando los datos obtenidos en pruebas de imagen (p.ej una Tomografía Computarizada) (Hrabe y cols., 2013). Los datos del TC son usados para crear un modelo CAD exacto del implante deseado (X. Li y cols., 2012).

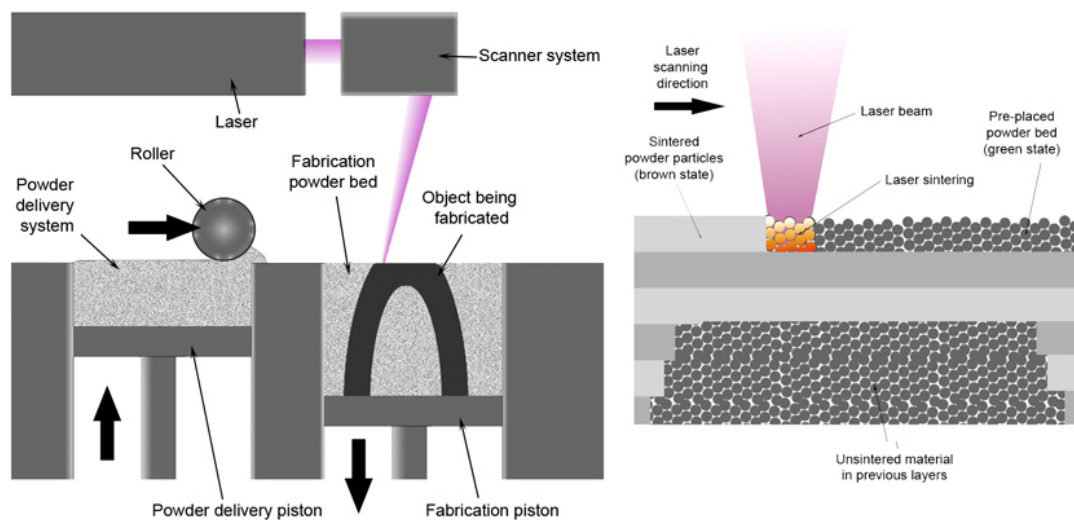


Figura 38: Esquema SLM. Figura obtenida de Wikipedia.

Tiene elevado cociente coste-eficiencia, especialmente en la predicción del volumen de implantes con estructuras porosas. La potencia del haz de electrones y la posibilidad de guiarlo cambiando el campo magnético a través del cual pasa el haz, aumenta su velocidad de producción. La utilización de EBM prescinde de la necesidad de utilizar un molde para el desarrollo de estructuras porosas, abaratando los costes de producción (Figura 39).

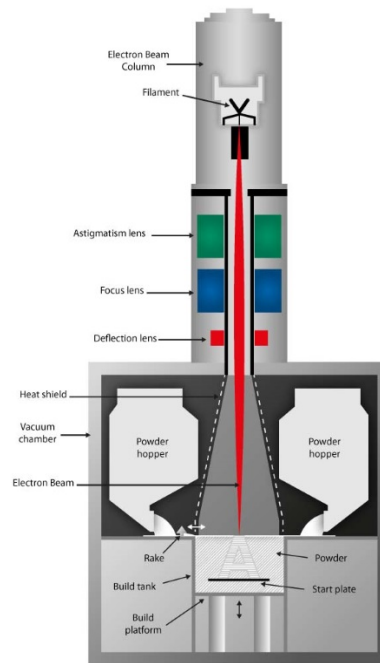


Figura 39: Esquema EBM. Figura obtenida de www.makerpartsfast.com.

5. Moldeo por deposición de fundidos (Fused Deposition Modeling (FDM))

Se trata de la primera técnica de prototipado rápido en extruir por una boquilla el material fundido.

Esta tecnología fue desarrollada por S. Scott Crump a finales de la década de 1980 y fue comercializada en 1991 por Stratas. Un filamento plástico o filamento de polímero cargado con partículas metálicas es introducido en una boquilla. La boquilla se encuentra por encima de la temperatura de fusión del polímero y puede desplazarse en tres ejes controlada electrónicamente. La pieza es construida con finos hilos del material que solidifican inmediatamente después de salir de la boquilla por enfriamiento (Jamróz y cols., 2018). El control preciso de la temperatura es fundamental para adquirir la estructura deseada.

La estructura viene determinada por varios factores, entre ellos el diámetro de la boquilla, la velocidad de deposición, el espaciado entre los filamentos en cada capa, el grosor de las fibras y el ángulo de deposición (Figura 40).

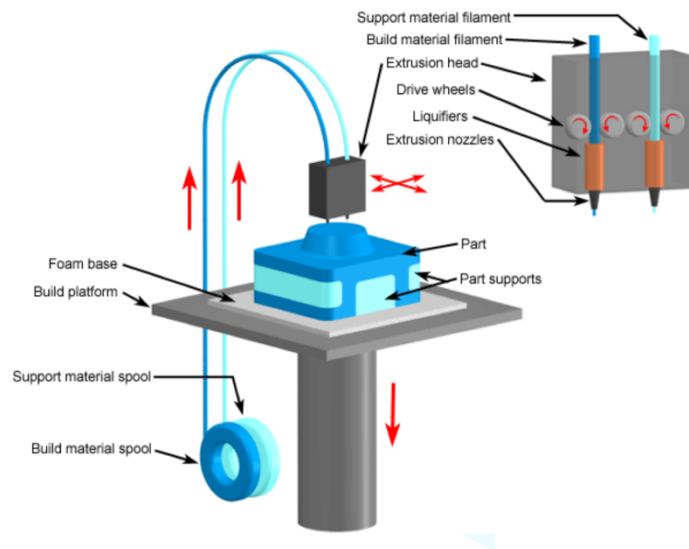


Figura 40: esquema de la técnica de Moldeo por Deposición de Fundidos (FDM).

Actualmente se utilizan varios materiales para este proceso de fabricación como: Acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), Poliláctico (PLA), Policarbonato, Policaprolactona (PCL), Polifenilsulfona (PPSU), Polieterimida (PEI) La polieterimida «Ultem 9085» es resistente al fuego y a los disolventes y Acetato de polivinilo (PVA) utilizado para soportes hidrosolubles.

Entre las desventajas de FDM se encuentran que los materiales termoplásticos estrechan el rango de posibles materiales que se puedan utilizar con esta técnica, por otro lado, el proceso es lento frente a otras técnicas de prototipado rápido. La superficie que genera es una superficie lisa que precisa un cubrimiento o modificación para favorecer la adhesión y crecimiento celular sobre ella. Finalmente es difícil concretar la microporosidad que promueve la neovascularización y crecimiento dentro de la estructura, así como la dificultad para incorporar células vivas durante la extrusión debido a las altas temperaturas del proceso (Chia & Wu, 2015)

6. Moldeo Robotizado (Robocasting)

La técnica fue desarrollada por primera vez en los Estados Unidos en 1996, y consiste en la extrusión de un fluido o tinta a través de una pequeña boquilla (Examiner & Marcantoni, 2002). La posición de la boquilla se controla, dibujando cada capa del modelo CAD. Esta técnica es distinta al modelado por deposición fundida, ya que no se basa en la solidificación o el secado para que la pieza retenga su forma después de la extrusión, sino a un cambio de la reología de la tinta.

El Moldeo Robotizado es en este momento la técnica más versátil en cuanto las variables que pueden introducirse en la composición y formulación del material o en la estructura porosa final (Smay, Cesarano, & Lewis, 2002). El Moldeo Robotizado permite imprimir, no solo suspensiones fabricadas a base de mezcla de polvos, sino también de partículas fabricadas ad hoc, permitiendo un muy buen control de la macroporosidad. Esta técnica de manufactura aditiva de suspensiones permitiría implementar el conformado prototipado con, entre otras, las tecnologías de diseño de gránulos obtenidos por atomización y/o congelación (freezing), de estructuras core-shell, e incluso de la mezcla de partículas inorgánicas con espaciadores (azúcar, almidón, poliestireno, etc.) y micelas. En definitiva, permitiría diseñar una estructura jerarquizada en el material poroso, y siempre desde la formulación de la suspensión (Deville S., 2006; Fu, 2011).

La técnica comienza con un procesamiento de los cortes en archivos STL (Stereolithography File Format) en capas de similar anchura que se ajusten al diámetro de la boquilla. El proceso se repite hasta completar la estructura tridimensional. Al finalizar el procedimiento el material es característicamente frágil y débil. Habitualmente le sigue un proceso de secado y sinterización que le concede las propiedades mecánicas deseadas.

Dependiendo de la composición de la tinta, la velocidad de impresión y el ambiente, el robocasting puede tratar con voladizos moderados y abarcar amplias regiones. Esto permite imprimir complejas estructuras en tres dimensiones, lo cual si se puede realizar con otras técnicas de manufactura aditiva, pero a unos costes mucho mayores. Una vez desarrollada la tinta, la técnica de robocasting permite hacer de forma rápida y sencilla

andamios cerámicos o metálicos, eso si, precisando una sinterización posterior (Figura 41).

Los usos de esta técnica de manufactura aditiva son múltiples, incluyendo el desarrollo de baterías de electrodos (Xiaoxing Liu y cols., 2011), cristales fotónicos (Gratson y cols., 2006), e Ingeniería de tejidos (Woodard y cols., 2007). Por todas las características mencionadas previamente esta técnica ha sido la utilizada para la fabricación de los implantes empleados en esta tesis.

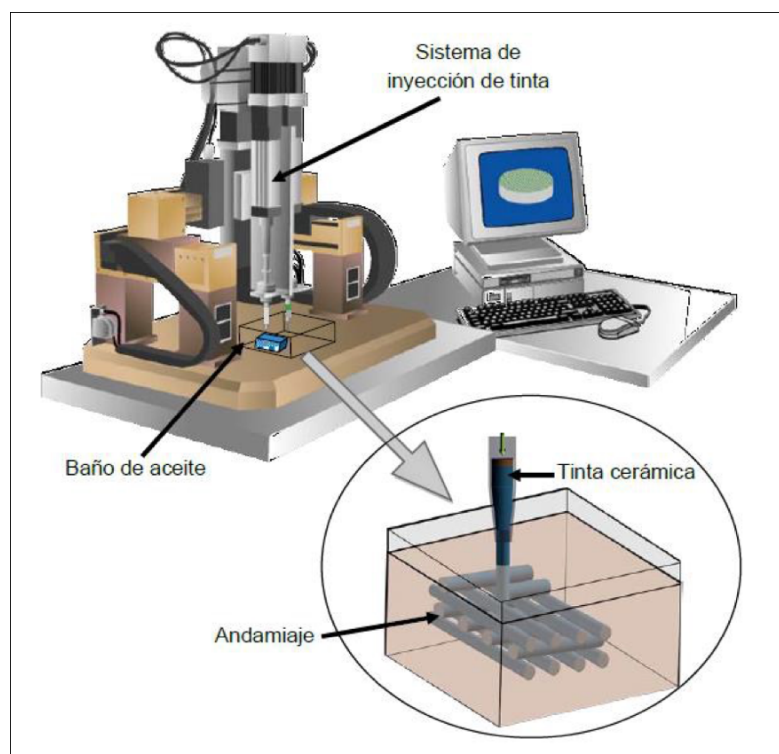


Figura 41: Esquema del proceso de técnicas de Robocasting.

II. JUSTIFICACIÓN

II. JUSTIFICACIÓN

El envejecimiento de la población, así como la mejoría de la calidad de vida ha hecho que la regeneración ósea se haya convertido en uno de los marcos de investigación más importantes en el campo de la medicina.

Actualmente la utilización de materiales metálicos en implantología y prótesis es una actividad desarrollada a nivel mundial, habiéndose impuesto en muchos campos a otros materiales. Se estima que solo en EE. UU. se colocan anualmente más de dos millones de implantes dentales y se estima que en 2030 se habrán realizado ya más de cuatro millones de cirugías protésicas de cadera y rodilla (Cheng, Humayun, Cohen, Boyan, & Schwartz, 2014). Este es un mercado en alza, como demuestran las cifras que indican que en EE. UU. para 2017 estaban proyectadas las compras de estos materiales en 46 billones de dólares (H. Do Jung y cols., 2015).

Este aumento del uso de estos materiales metálicos esta influenciado en parte por el aumento de edad de los pacientes y por el aumento de las expectativas de calidad de vida de los mismos. En España las personas entre 65 y 79 años ya representan el 12,8% de la población, mientras que las personas mayores de 80 años constituyen el 6,2%. La esperanza de vida de un español al nacer es de 83,5 años siendo la máxima de la Unión europea (fuente Instituto Nacional de Estadística), donde la media es de 81,0 años (Figura 42).

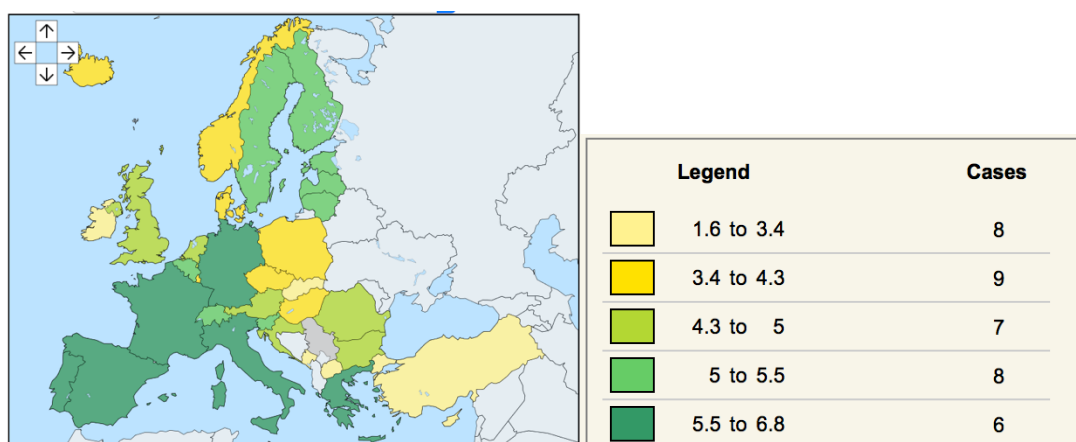


Figura 42: Porcentaje de personas mayores de 80 años en Europa en 2017. Fuente Eurostat. Podemos ver como el sur de Europa tiene los porcentajes más altos de personas con edad superior a los 80 años.

A nivel del tejido óseo, a partir de los 30 años se produce una disminución en su densidad, lo cual puede conllevar una disminución de la resistencia mecánica de hasta un 40%, que puede llegar a ser aún mayor en el caso de mujeres. La disminución de las propiedades mecánicas del hueso puede verse acentuado por la degradación debida a tensiones cíclicas y al desgaste superficial en las articulaciones.

Las causas que pueden producir defectos óseos son múltiples (Cowan, Soo, Ting, & Wu, 2005), entre las más frecuentes caben destacar:

- La mala consolidación de fracturas, normalmente asociado a una mala reducción de las mismas o factores asociados al paciente que dificultan la correcta consolidación, como una dificultad de vascularización en pacientes diabéticos o pacientes con huesos muy osteoporóticos.
- Los traumatismos, ya que pueden asociar defectos óseos que no se pueden reducir inicialmente, lo cual puede conllevar que se produzca un defecto en el hueso que precise una posterior reconstrucción.
- Las resecciones quirúrgicas asociadas principalmente a cirugía oncológica, las cuales pueden crear defectos a nivel del hueso.
- El edentulismo en aquellos pacientes con pérdidas dentales de larga evolución, donde se produce la pérdida del hueso alveolar, que es el responsable del soporte dental, asociando un defecto óseo que en algunas ocasiones debe reconstruirse para poder realizar una rehabilitación implantológica del paciente.
- Los trastornos degenerativos como son la osteoporosis o aquellas enfermedades que producen resorción ósea (enfermedad de Paget, Mieloma Múltiple...).
- La osificación a nivel de prótesis de cadera y recambios.

A pesar de las diferentes técnicas y avances en las últimas décadas, hoy en día se continúa considerando como tratamiento “gold-standard” para la regeneración ósea el uso de injertos autólogos. Esto es debido a su alta histocompatibilidad y la ausencia de

rechazo inmunológico, al tratarse de tejido del propio individuo. Los injertos autólogos se caracterizan por poseer los componentes esenciales para lograr una correcta osteoinducción (p. ej. proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y otros factores de crecimiento) y osteoconducción (p. ej. una matriz tridimensional porosa).

Pero los injertos autólogos no son una técnica libre de morbilidad. La realización de trasplantes óseos autólogos son procedimientos que pueden resultar en un considerable daño de la zona donante, pudiendo asociar deformidad de dicha región, cicatrices inestéticas y asociarse con importantes riesgos quirúrgicos como son el sangrado, la inflamación, infección o dolor crónico (Calori y cols., 2014; Dimitriou, Mataliotakis, Angoules, Kanakaris, & Giannoudis, 2011). En la figura 43 se puede apreciar la infección de la herida quirúrgica tras el tallado de un colgajo osteocutáneo de peroné para la reconstrucción de un defecto mandibular. También pueden resultar una fuente de hueso escasa en situaciones en que se precise un gran volumen óseo para reconstruir el defecto.

El objetivo de nuestro grupo es desde su creación la búsqueda de técnicas con el mismo efecto que los injertos autólogos, pero evitando sus complicaciones, logrando que el nuevo hueso se encuentre totalmente integrado con el hueso local y pueda ejercer las funciones del hueso nativo.



Figura 43: Herida sobreinfectada tras tallado de colgajo peroneo izquierdo.

Para ello entendemos que el correcto conocimiento de la anatomía y fisiología ósea debe servir de inspiración para el desarrollo de implantes que permitan el crecimiento biológico natural en su interior y promuevan la remodelación ósea, más allá de simplemente aportar la forma y función final del tejido (Sargeant y cols., 2008). Para lograr la promoción de la angiogénesis tuvimos como objetivo lograr el desarrollo de implantes que pudieran incorporar factores de crecimiento y poseyeran la porosidad necesaria para el crecimiento vascular interno, simulando la estructura de andamiaje que posee la matriz orgánica mineral del hueso (Amin Yavari y cols., 2014). Incluso, el diseño micro- y nanométrico de la superficie de estos implantes es crítico para la adhesión, migración, diferenciación y proliferación celular (Brie y cols., 2014).

Los compuestos de Hidroxiapatita, así como distintos polímeros, incluyendo PLA, PLGA, quitosano y colágeno han demostrado éxito en estudios *in vitro/in vivo* (Duan y cols., 2010; Goodridge, Dalgarno & Wood, 2006; Simpson y cols., 2008). Aunque, por otro lado, los polímeros y las cerámicas han demostrado una pobre tasa de resistencia a las cargas fisiológicas a las que son sometidos los huesos, tratándose de materiales poco fiables. Como alternativa, las estructuras metálicas suponen un atractivo debido a su resistencia mecánica y comportamiento a la fatiga en largos periodos de tiempo.

El titanio debido a la combinación de sus excelentes propiedades mecánicas y a su biocompatibilidad es actualmente uno de los biomateriales más utilizados. Comparado con otros biomateriales, como las aleaciones de cromo-cobalto, el titanio tiene mayor resistencia a la corrosión, posee buena resistencia a las pruebas de fatiga y presenta una superficie que le provee una gran biocompatibilidad. Dada su excelente biocompatibilidad el titanio puro (Ti) y sus aleaciones (p.ej. Ti4Al6V) han sido utilizados como prótesis para reemplazo de caderas, en el tratamiento de columna vertebral, fracturas óseas y rehabilitación implantológica dental.

Los implantes dentales de Titanio poseen una tasa de éxito por encima del 95% en pacientes sin patologías previas relevantes, aunque algunos factores continúan siendo una limitación para la correcta osteointegración, como por ej. el tabaco y los pacientes con diabetes, en los cuales las tasas de integración se encuentran drásticamente reducidas (Cheng y cols., 2014). Otros factores limitantes frecuentes en pacientes con los que estamos acostumbrados a trabajar los cirujanos que tratamos patología

oncológica de cabeza y cuello son la radioterapia a nivel de los maxilares, así como la osteonecrosis asociada a medicamentos. Otros problemas asociados son la pérdida de la capacidad de remodelado óseo y la discrepancia biomecánica que existe entre los implantes clásicos y el hueso humano (Brie y cols., 2014).

El aumento de edad de la población conlleva una menor densidad ósea y una consecuente menor tasa de integración, añadiendo a esto que mucho de los implantes ortopédicos utilizados hoy en día precisarán un recambio en 12-15 años. Esto explica las necesidades que presenta nuestra sociedad de mejorar estos dispositivos para lograr una mejor integración a largo plazo y una menor tasa de resorción (Khorasani, Goldberg, Doeven, & Littlefair, 2015; Mahomed y cols., 2003).

Un interesante nuevo punto de vista frente al problema de reabsorción ósea que presentaban estos materiales ha sido el pasar de una estructura maciza a intentar desarrollar un implante con porosidad interconectada que permita una correcta vascularización y regeneración para la integración del biomaterial (concepto de “self-assembling” biomaterial). El hueso trabecular humano de la mandíbula tiene una rango de porosidad del 70-90%, el cual varía con la localización y factores propios de cada individuo (Misch y cols., 1999). Tiene sentido que si nuestro objetivo es reponer hueso nativo tratemos de simular sus propiedades. Los primeros casos descritos se asociaban a materiales reabsorbibles (Hwang y cols., 2002) y más recientemente conteniendo otras estructuras bioactivas (Hartgerink, Beniash, & Stupp, 2001).

En los últimos años ha habido un gran avance en el desarrollo de metales porosos de titanio para permitir la correcta regeneración ósea y disminuir las tasas de reabsorción ósea secundario a las cargas soportadas por estos materiales. Los implantes porosos tienen la ventaja de acelerar la osteoconducción y osteoinducción entre el implante y el hueso. La estructura porosa interconectada facilita la introducción de células mesenquimales y agentes osteoinductivos como las BMPs y los vasos sanguíneos. Algunos artículos defienden que el tamaño del poro necesario para lograr la colonización de osteoblastos, crecimiento vascular y finalmente deposición de hueso debe ser de 200-500 micras. De todas maneras, con un tamaño mayor del poro, la resistencia del implante se ve significativamente disminuida, este es uno de los motivos por los que las cerámicas porosas solo pueden utilizarse clínicamente en el uso de

pequeños defectos y no en zonas que sufren cargas soportadas. Si bien este hecho en los implantes porosos metálicos no es tan crítico, ya que las cerámicas son más frágiles intrínsecamente.

Los implantes porosos de titanio tienen unas propiedades mecánicas superiores a otros materiales como pueden ser las cerámicas de fosfato cálcico o los polímeros. A pesar de que su potencial ha sido reconocido durante años, el desarrollo de estructuras porosas abiertas se ha visto limitado por la complejidad en su producción. Es complejo producir una estructura porosa con el diseño adecuado que combine los requerimientos osteoconductivos y mecánicos.

Las principales limitaciones de las técnicas de fabricación de estructuras metálicas porosas descritas hasta el momento están ligadas a la dificultad de controlar con precisión el tamaño, la geometría y la distribución de poros, así como la construcción de canales dentro de la estructura. Esto hace que la porosidad de los materiales fabricados por estas técnicas tenga una reproducibilidad cuanto menos aleatoria, y por tanto un comportamiento mecánico y funcional bastante poco predecible. La necesidad de superar estas limitaciones ha motivado el desarrollo de nuevas tecnologías para la fabricación de estructuras porosas tridimensionales mediante técnicas de Manufactura Aditiva (AM - Additive Manufacturing).

Las técnicas de manufactura aditiva han supuesto una revolución dentro de diferentes sectores industriales, como se puede apreciar en la figura 44, donde Frost y Sullivan hacen una estimación del futuro del gasto en técnicas de manufactura aditiva a nivel global entre los años 2015 a 2025, estimando que el rango de crecimiento de las técnicas de manufactura aditiva será de un 18,6% (Frost & Sullivan, 2014).

La relevancia actual y el creciente interés de las tecnologías de manufactura de metales se pone de manifiesto en la Figura 45, donde se muestra la evolución de la demanda de materiales metálicos para su uso en manufactura aditiva, así como su uso en las diferentes industrias (Aeroespacial, Salud, Transporte...).

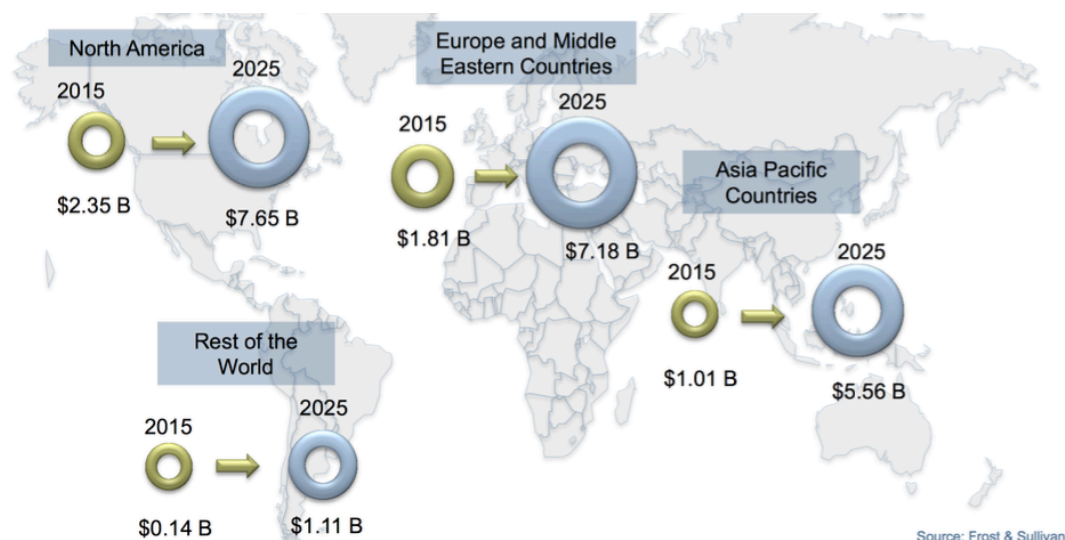


Figura 44: Crecimiento estimado de las técnicas de manufactura aditiva entre los años 2015 y 2025 (Frost & Sullivan, 2014).

El número de estudios que han abarcado el desarrollo de las técnicas de Manufactura Aditiva de metales ha tenido un crecimiento exponencial. En la Figura 46 se presenta la evolución del número de publicaciones por año en los últimos 20 años. Del total de publicaciones recogidas (2857), el 75% corresponde a los últimos 5 años.

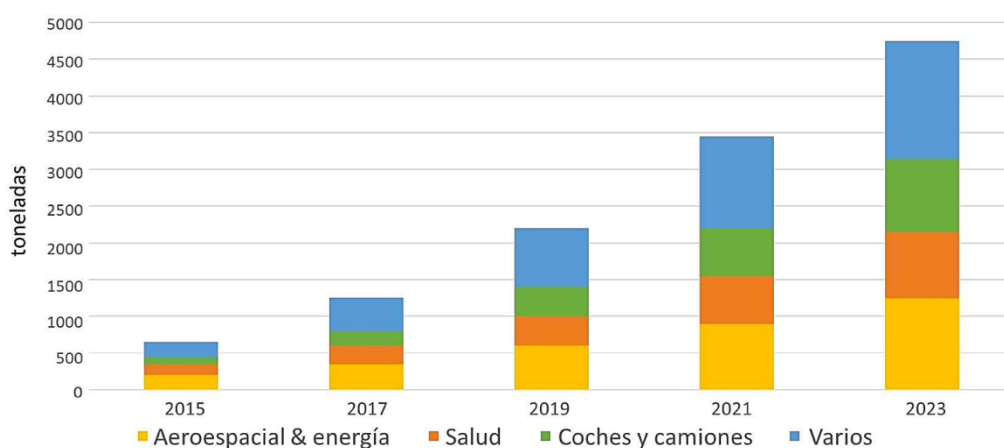


Figura 45: Demanda de polvo para fabricación aditiva (Fuente: Estudio de mercado EPMA, 2017).

Una de las grandes ventajas de las técnicas de manufactura aditiva es la rapidez en su procesamiento, al no necesitar moldes sacrificables o retirada del material sobrenadante, y el ahorro de recursos frente a los métodos tradicionales de fabricación. Industrialmente, el uso de este tipo de técnicas reduce extraordinariamente los plazos de fabricación de nuevos productos, al permitir que los cambios en el diseño de piezas puedan implementarse de forma inmediata en el proceso productivo, reduciendo a la vez los costes de mecanizado y de materia prima y/o recortes. Esto implica un menor impacto ambiental y un buen equilibrio económico (Chia & Wu, 2015).

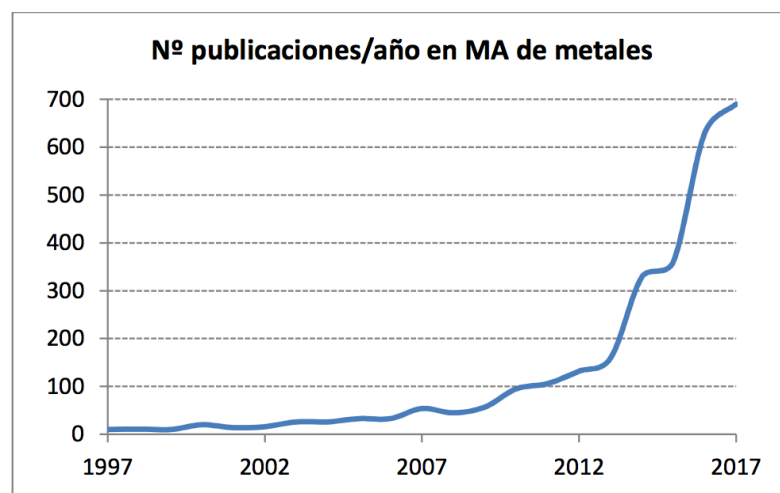


Figura 46: Evolución del número de publicaciones por año en manufactura aditiva de metales en los últimos 20 años (1997-2017). Fuente: Scopus.

El posible ahorro que suponen estas técnicas frente a los métodos convencionales de producción hace que muchas compañías inviertan en I+D+I para su estudio. Un claro ejemplo es la industria médica, donde se lleva trabajando con esta tecnología 15 años y se espera que la producción con manufactura aditiva crezca un 23% entre los años 2015 y 2025 (Frost & Sullivan, 2014). En la figura 47 podemos observar las previsiones de gasto en técnicas de manufactura aditiva por sectores, pasando de un gasto en 2015 de 5,31 billones de dólares a 21,5 billones de dólares en 10 años, estimándose que en el mercado de la impresión 3D en 2025 el 51% de la actividad lo coparan las industrias aeroespacial, automovilística y médica. Se estima que los costes logísticos de estas técnicas se reducirán un 80% respecto a las técnicas convencionales.

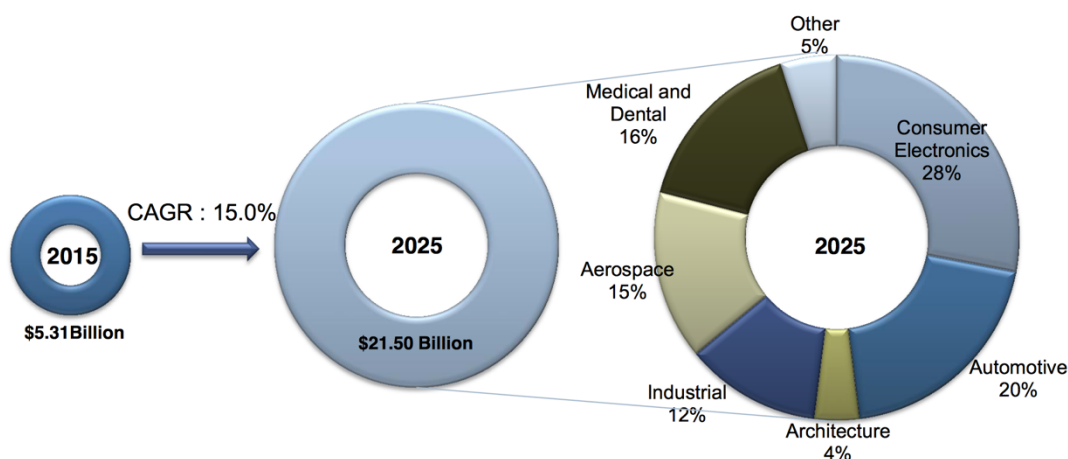


Figura 47: Gasto previsto en técnicas de impresión 3D en el año 2025. Fuente: Frost & Sullivan, 2014.

El desarrollo económico en un entorno global ha concentrado la producción en ubicaciones geográficas muy concretas con grandes multinacionales que dominan ámbitos productivos concretos. Por otra parte, el consumidor es cada vez más exigente, quiere productos personalizados que lo distingan de la sociedad. La personalización es una oportunidad para encontrar nichos de mercado muy concretos dedicados a una clientela que no ve satisfechos sus deseos. La fabricación aditiva puede modificar la producción de bienes en el futuro; en vez de una fabricación en masa localizada geográficamente, la fabricación aditiva permite la personalización de los productos, lo que puede hacer volver a los sectores productivos de vuelta al primer mundo.

Como se puede observar en la figura 48 a medida que se ha evolucionado en el desarrollo de técnicas de manufactura aditiva se han ido abaratando los costes de producción.

Desde el grupo de Medicina Regenerativa, perteneciente al Instituto de Investigación 12 de Octubre, se ha buscado establecer una línea de investigación innovadora que pueda suponer una base para el desarrollo de nuevos proyectos en el campo de la ingeniería de tejidos. Las bondades de los implantes porosos de titanio han sido ampliamente desarrolladas en la introducción, un cierto grado de porosidad en los implantes facilita el crecimiento óseo a través de sus poros y el remodelado de la

estructura ósea, aumentando la superficie de contacto material-hueso y concediendo gran estabilidad.

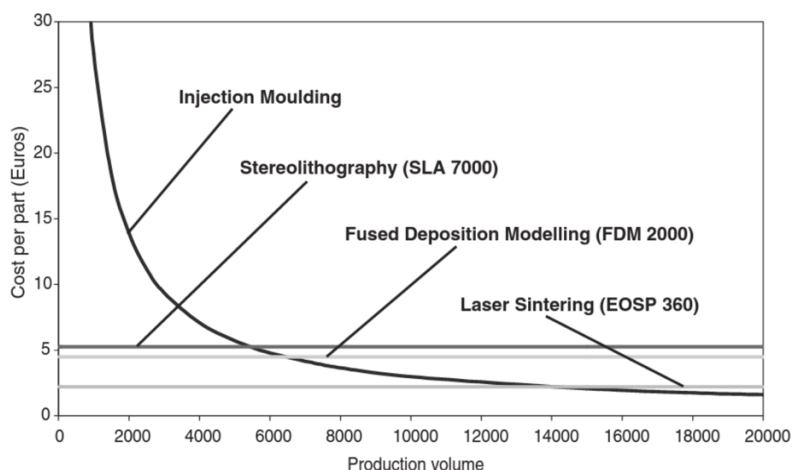


Figura 48: Coste por unidad en función del volumen producido. Fuente: Rapid Manufacturing: An Industrial Revolution for the Digital Age. Neil Hopkinson (AMRG, Loughborough, UK) 2005.

Tras la realización de una búsqueda bibliográfica exhaustiva en diferentes bases de datos (MEDLINE, EMBASE, Cochrane Database of Systematic Reviews, etc.) sobre la utilización de implantes porosos de titanio como biomateriales, la realidad es que la bibliografía encontrada es muy escasa. Actualmente se están fabricando estructuras metálicas tridimensionales complejas usando distintas técnicas aditivas, como la impresión 3D, Deposición de metal directa, Selective Laser Melting, Selective Laser Sintering o Electron Beam Melting.

El Robocasting es una técnica aditiva en la cual un filamento de tinta a través de una boquilla da forma al objeto capa a capa. Mediante esta técnica, el modelo a fabricar se divide en capas con diseño asistido por computadora (CAD) 3D, el fluido es extruido a través de una pequeña boquilla, dando así lugar a la forma del modelo previo (Figura 49). Una vez se ha conformado, se procede al paso de secado y sinterización.

Entre sus ventajas, la técnica de robocasting conlleva un menor gasto energético, lo cual no solo se plantea como un beneficio económico en su producción, sino también en una menor contaminación a la hora de producirlo. Tampoco precisa un molde, y puede

definirse la porosidad deseada obteniendo una alta reproductibilidad. La técnica presenta su mayor desventaja frente a otras técnicas en la dificultad de tener los conocimientos necesarios para realizar la suspensión que crea la estructura.

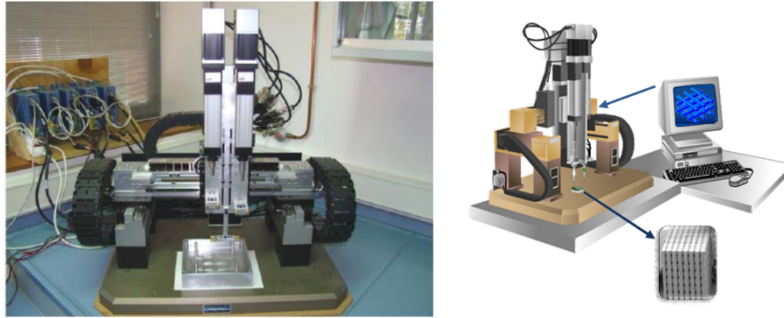


Figura 49: Equipo de moldeo robotizado.

MULTIMAT-CHALLENGE es un programa financiado por la Comunidad de Madrid entre el periodo de octubre de 2014 y diciembre de 2018 y constituye una línea de trabajo interdisciplinar con el objetivo de mejorar en tres áreas principales como se esquematiza en la figura 50:

- Transporte ecológico
- Energía sostenible
- Salud y Bienestar.

El grupo de Medicina Regenerativa (BIOMAT-12) queda emplazado en el área de Salud y Bienestar, siendo dentro de esta el desarrollo de materiales porosos su línea de investigación (Figura 51).

La entrada del grupo de Medicina Regenerativa en el programa MULTIMAT-CHALLENGE en el año 2014 (www.multimat.org), permitió la colaboración con grupos de ingeniería especializados en las técnicas de procesamiento de materiales metálicos, especialmente de la técnica de pulvimetalurgia. La pulvimetalurgia o metalurgia de polvos es un proceso de fabricación que, partiendo de polvos finos y tras

su compactación para darles una forma determinada, se calientan en una atmósfera controlada para la obtención de la pieza.

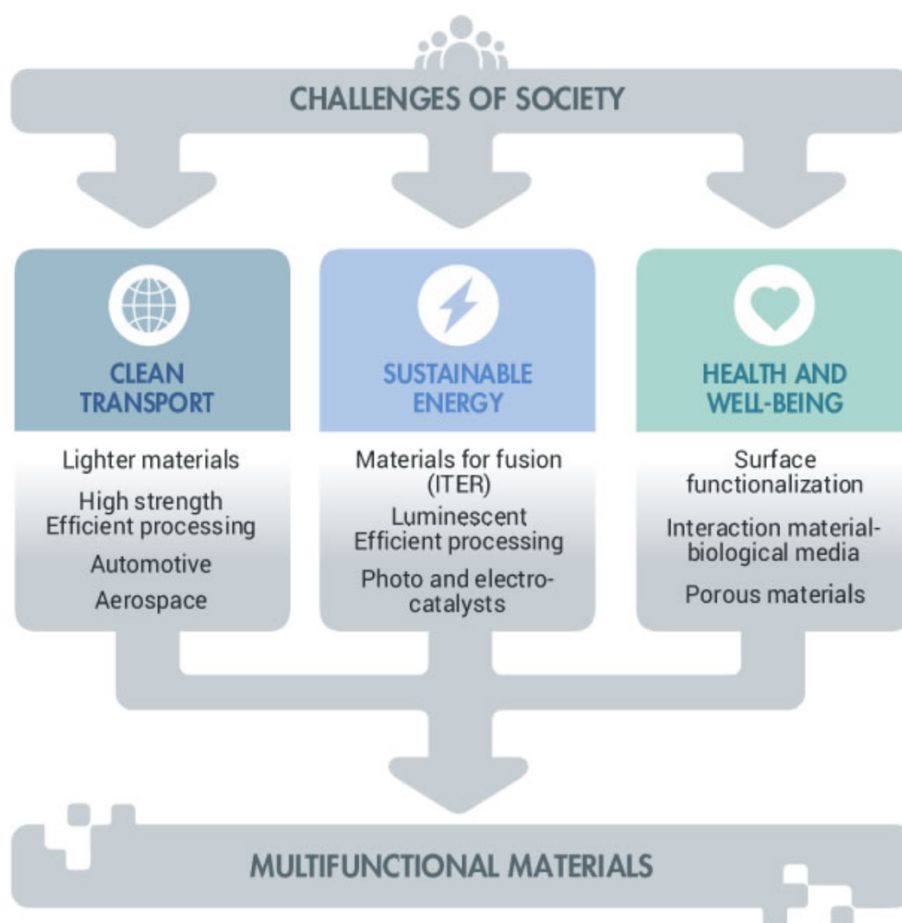


Figura 50: ramas de estudio del proyecto MULTIMAT-CHALLENGE.

La base con la que nace este proyecto es el trabajo multidisciplinar en distintos campos para dar respuestas a las necesidades que nos plantea nuestra sociedad. La Dra. Molero y la Dra. Ferrari del Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV) perteneciente al Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV-CSIC) junto con el grupo de tecnología de polvos de la UC3M (GTP-UC3M) desarrollaron unos implantes porosos de titanio mediante técnica de robocasting. Dentro del espíritu de colaboración interdisciplinar del programa MULTIMAT-CHALLENGE, el ICV-CSIC nos cedió estas estructuras a nuestro grupo (BIOMAT-12) para su estudio como biomateriales dentro de la línea de salud y bienestar.

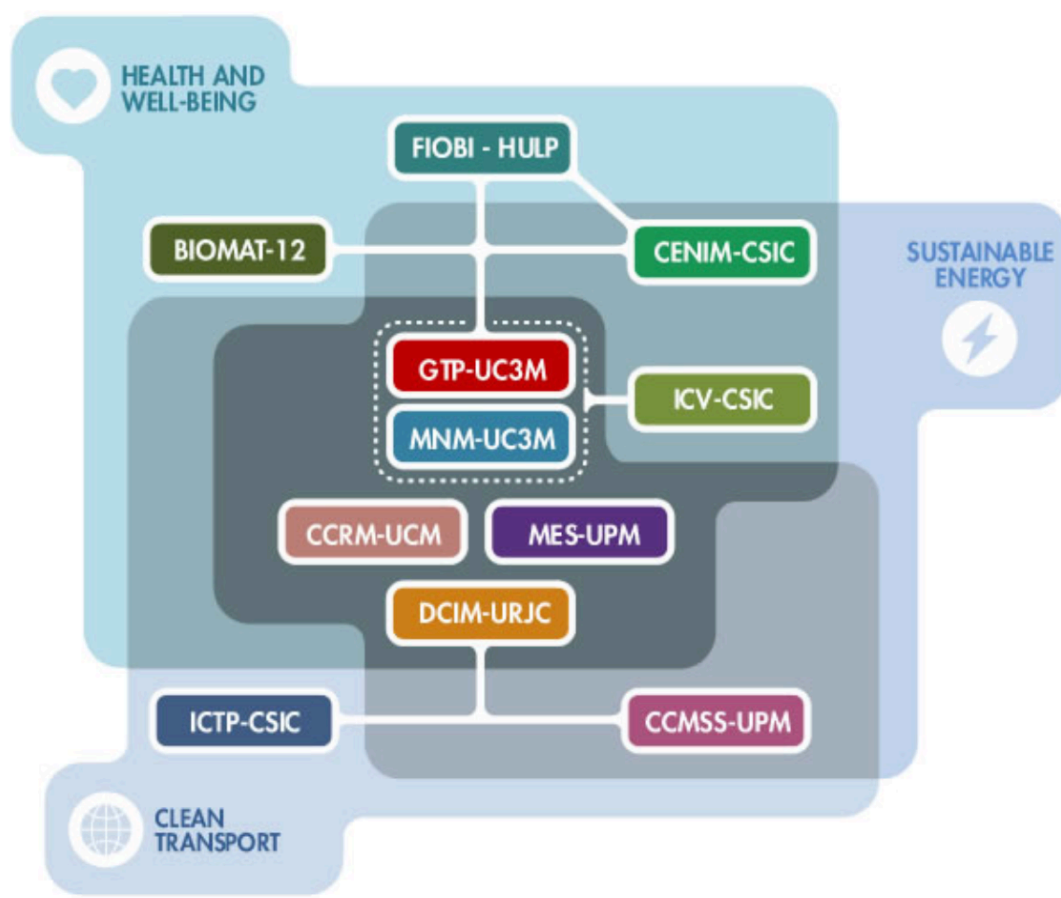


Figura 51: Distribución de los diferentes grupos miembros del convenio MULTIMAT-CHALLENGE.

Este estudio ha generado unos resultados previos que ya han sido presentados y acreditados en diversos congresos y reuniones científicas en forma de Comunicaciones:

1. Título: Estudio de la capacidad de regeneración ósea de implantes microporosos de titanio procesados mediante robocasting. Lugar: Madrid. Fecha: 28 de abril de 2016. Carácter: I Reunión Anual de MULTIMAT-CHALLENGE. Autor: F. Merino Domingo.
2. Título: Estudio in vitro de adhesión y proliferación ósea en implantes microporosos de titanio desarrollados mediante técnicas de moldeo robotizado y deposición. Lugar: Alicante. Fecha: 9-10 junio 2016. Carácter: 16 Congreso de Cirugía Oral e Implantología. Autores: M. Mejía Nieto; F. Merino Domingo; V. Ramos; A. Civantos; I. Ruíz; R. Gutiérrez.

3. Título: Estudio de la capacidad de regeneración ósea de implantes microporosos de titanio procesados mediante robocasting. Lugar: Madrid. Fecha: 5 de Abril de 2017. Carácter: Jornada de Materiales: “Materiales para los restos de la Sociedad MULTIMAT-CHALLENGE”. Autor: F. Merino Domingo.
4. Título: Estudio in vivo de adhesión y proliferación ósea en implantes microporosos de titanio desarrollados mediante técnicas de moldeo robotizado y deposición electroforética. Lugar: Ibiza. Fecha: 17-18 de mayo de 2018. Carácter: 17 Congreso de Cirugía Oral e Implantología. Autores: Merino Domingo F.; Segura-Illa M; Ortiz Reina J.A.; Ferrari B.; Gordo E.; Sánchez Aniceto G.
5. Título: In vivo bone cell adhesion and proliferation study in microporous implants. Lugar: Múnich. Fecha: 18-21 de septiembre de 2018. Carácter: 24 congreso Sociedad Europea Cirugía Maxilofacial. Autores: Merino Domingo F.; Segura-Illa M; Ortiz Reina J.A.; Sánchez Aniceto G.
6. Título: Estudio in vivo de adhesión y proliferación celular en implantes microporosos de titanio desarrollados mediante técnicas de moldeo robotizado (Robocasting). Fecha: 16-17 de octubre de 2020. Carácter: I Congreso online SECOMCyC Joven. Autores: Merino Domingo F.; Santás M; Ferrari B.; Gordo E.; Flores de la Cal A.

Además, la comunicación titulada “Estudio in vivo de adhesión y proliferación ósea en implantes microporosos de titanio desarrollados mediante técnicas de moldeo robotizado y deposición electroforética.” recibió el **Premio a la Mejor Comunicación Oral** en el 17 Congreso de Cirugía Oral e Implantología celebrado en Ibiza en 2018.

Por otro lado, la comunicación titulada “Estudio in vivo de adhesión y proliferación celular en implantes microporosos de titanio desarrollados mediante técnicas de moldeo robotizado (Robocasting).” recibió el **Premio a la Mejor Comunicación Poster** en el I Congreso online SECOMCyC Joven celebrado en 2020.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a estos antecedentes planteamos la siguiente hipótesis:

- Los implantes porosos de titanio desarrollados mediante técnica de robocasting son unos implantes validos para reparar defectos óseos, siendo por su crecimiento óseo intraimplantario y la disminución de la resorción ósea perimplantaria, una buena alternativa a los implantes macizos clásicos.

Planteándonos la anterior hipótesis planteamos los siguientes objetivos:

Nuestro objetivo fue el estudio del comportamiento biológico de implantes porosos de titanio con diferente porosidad desarrollados por el Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV-CSIC) junto con el grupo de tecnología de polvos de la UC3M (GTP-UC3M) mediante técnica de robocasting dentro del programa MULTIMAT-Challenge.

En base a esto, los OBJETIVOS ESPECÍFICOS son:

1.- Estudios *in vitro* para valorar la citocompatibilidad y ausencia de citotoxicidad sobre las superficies de tres tipos de implantes porosos de titanio sobre las líneas celulares C2C12 y MC3T3-E1.

2.- Valorar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tipos de implantes de los que disponíamos respecto a la adhesión y proliferación celular en los estudios *in vitro*.

3.- Estudiar la capacidad de inducción ósea de proteínas morfogenéticas cuando se tratan las superficies de los implantes microporosos de titanio, y si existían diferencias estadísticamente significativas respecto a las no tratadas.

4.- Estudio de la capacidad de regeneración ósea *in vivo* en un modelo animal de defecto óseo en calota de conejo de estos implantes microporosos de titanio.

5.- Estudio de la resorción perimplantaria de los tres tipos de implantes en un modelo animal.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PRODUCCIÓN DE IMPLANTES POR MOLDEO ROBOTIZADO (ROBOCASTING) Y CARACTERÍSTICAS

En la fabricación de estructuras porosas mediante la técnica de moldeado robotizado los pasos son los siguientes:

- el diseño de la estructura 3D
- la elaboración de la tinta
- la propia impresión
- el tratamiento térmico de sinterización

Estas cuatro fases están relacionadas entre sí, es decir, un error en una de ellas puede condicionar el resto. Por lo que para obtener un buen resultado es necesario controlar una gran cantidad de factores, tanto internos (tamaño y forma de las partículas, aditivos...) como externos (humedad ambiental, temperatura, contaminación...).

A continuación, exponemos el protocolo seguido por parte del Instituto de Cerámica y Vidrio para el desarrollo de los implantes que utilizamos en esta tesis (Molero y cols., 2016).

Los implantes se prepararon mediante técnica de robocasting utilizando pastas obtenidas a partir de las mezclas de polvo de titanio puestos en suspensión acuosa, a las cuales hubo que añadir un agente que altere la viscosidad para lograr las propiedades viscoelásticas óptimas. El titanio utilizado fue un polvo comercial fabricado por atomización por plasma en medio inerte (argón) y suministrado por la compañía AP&C Inc (Canadá), con una pureza de 99,5-99,8%.

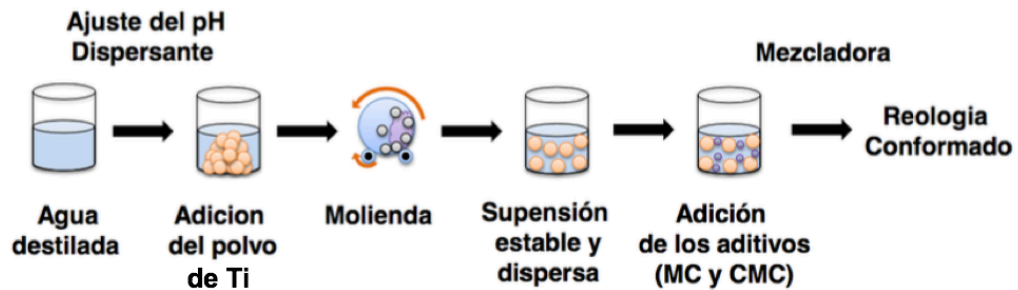


Figura 52: Protocolo de preparación de tintas para moldeo robotizado (Molero y cols., 2016).

En el caso de las muestras con las que se realizó el estudio se les añadió carboximetilcelulosa que presenta una viscosidad de 40.000 cp (mPas). La adición de la carboximetilcelulosa se hace en polvo sobre la suspensión estable y homogénea de partículas de titanio obtenida tras la molienda de bolas; aunque la carboximetilcelulosa se elimine durante el proceso de sinterización se trata de un material compatible con el ser humano. Posteriormente se introduce la suspensión en una mezcladora a 800-1200 r.p.m. (ARE 250, Thinky Corporation, Japon) con bolas de circona, con el fin último de facilitar el proceso de homogenización de todos los componentes (Figura 52).

La fabricación de estos andamiajes se realizó a partir de las tintas elaboradas con el procedimiento anterior y utilizando el equipo de deposición robótica (D Inks, Stillwater, OK, EE. UU.). Una vez seleccionado tanto el aditivo óptimo como su cantidad (50 g/L de CMC), se fabricaron diferentes andamiajes variando el diámetro de la boquilla de impresión y el espaciado entre barras del andamio (Figura 53).






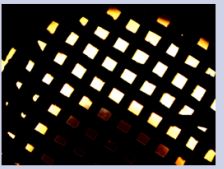

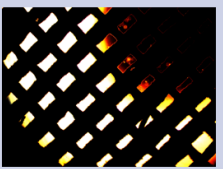
Figura 53: Andamiajes en verde, previo al proceso de sinterización. (Molero y cols., 2016).

Tras la etapa de impresión las muestras se encuentran “en verde”, siendo necesario un tratamiento térmico de sinterización para eliminar los aditivos y proporcionar resistencia mecánica al material. Las condiciones de sinterización (temperatura y tiempo) también se estudiaron de forma que se mantenga un grado de porosidad elevado necesario para su aplicación. Las muestras utilizadas en este estudio se sinterizaron a 1100°C durante 30 min en alto vacío.

De las distintas configuraciones que se estudiaron, se seleccionaron los tres tipos de implantes que presentaban mejores características mecánicas:

- Boquilla de 410 μm : - Espaciado de 400 μm
- Espaciado de 600 μm
- Boquilla de 250 μm : - Espaciado de 800 μm

Tabla 10: Parámetros de diseño de los implantes y caracterización de porosidades.

Tipo de muestra	A (PA400)	B (PA600)	C (PR800)
Diámetro de boquilla (μm)	410	410	250
Espaciado (μm)	400	600	800
Porosidad total (%)	66,16	77,50	80,90
Porosidad cerrada (%)	14,89	14,51	14,88
Porosidad abierta (%)	51,27	62,99	66,02
Imagen macroscópica			
Imagen microscópica			
Valores de dureza (GPa)	2,48	2,13	2,29

Cuando utilizamos el término punta hablamos del tamaño del diámetro de la boquilla por la cual se extruye la suspensión. En nuestro caso la punta azul tendrá un diámetro de 410 μm , mientras que la punta roja de 250 μm . El espaciado se refiere a la distancia que se dejó entre cada filamento a la hora de imprimir cada lámina. En la tabla 10 se

describen los parámetros de cada uno de los implantes que dispusimos y se indica la nomenclatura de las muestras que se va a utilizar a lo largo de la tesis.

En la figura 54 se puede apreciar a microscopía electrónica de distintos aumentos la disposición de los filamentos y la superficie rugosa de las barras, así como un esquema de la disposición de los filamentos y el espaciado en el ejemplo de las muestras PA 400.

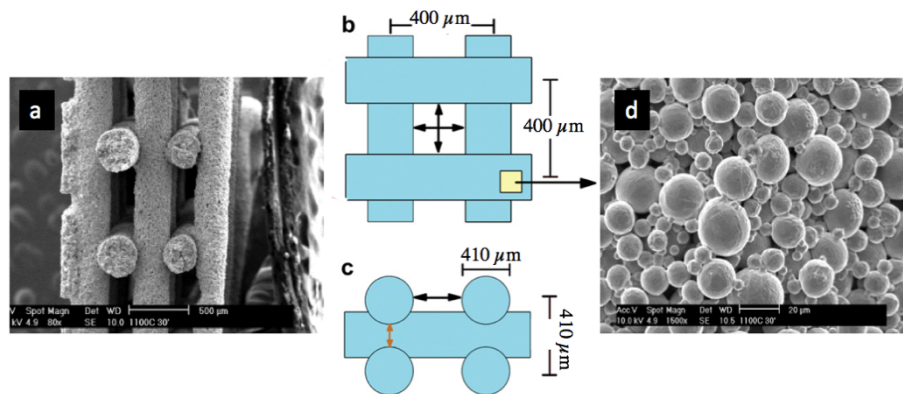


Figura 54: Visualización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de la muestra PA 400. a) Vista general a 80 aumentos del implante. b) y c) esquema de la disposición y espaciado de los filamentos. d) vista a 1500 aumentos de la superficie de la barra.

2. ESTUDIO IN VITRO

2.1. Cultivo celular

Se diseñó un estudio in vitro para valorar las características de adhesión y proliferación celular sobre las superficies de los implantes microporosos de titanio para los tres tipos de muestras estudiadas según la nomenclatura de la tabla 10.

Se realizó un cultivo celular con dos tipos de cepas celulares:

- Cultivo celular de células C2C12-GFP: línea celular adherente premioblástica de músculo de ratón, adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1772-Manassas, Virginia). Dado que los implantes son muestras opacas, las células de esta línea se cultivaron con GFP (Green fluorescent protein) para poder visualizarlas.
- Cultivo celular de células MC3T3-E1: línea celular adherente preosteoblástica de ratón adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC, CRL-2593-Manassas, Virginia). Estas células no se pueden apreciar cuando el material es opaco y por ello se hacen determinaciones metabólicas e inmunocitoquímicas para evaluar su adhesión y proliferación en los implantes.

El mantenimiento de los cultivos se realizó en frascos de 25 cm² de superficie utilizando como medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) alto en glucosa enriquecido con suero fetal bovino 10% y antibiótico penicilina /estreptomicina (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina).

La expansión celular se realizó en condiciones estériles cada 4 días, una vez alcanzada una confluencia celular del 80-90%. Para ello, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células con tampón fosfato salino o PBS y se utilizó tripsina para despegar las células de la superficie de cultivo. Para inactivar la tripsina, se añadió medio DMEM completo y se determinó el número de células obtenidas mediante

cámara de Neubauer. Para la expansión celular, las células se sembraron de nuevo a concentración de 2500 -3000 células por cm^2 de superficie de cultivo. Las placas sembradas se incubaron en estufa de CO_2 (Jouan), a 37°C , con una humedad relativa del 90% y 5% de CO_2 .

Para los ensayos de adhesión y proliferación celular la densidad celular empleada fue de 5.000 células/ cm^2 y 10.000 células/ cm^2 , respectivamente. Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado empleando células de pase inferior a 15 y en placas de 48 pocillos recubiertas previamente con los filmes de quitosano. La siembra de células sobre los filmes se realizó por triplicado, previa tripsinización del pase celular y conteo en cámara Neubauer. La proteína rhBMP-2 fue obtenida, purificada y plegada hasta su conformación activa por la empresa Noricum, S.L. Se incorporó a cada placa una cantidad fija de rhBMP-2 de 10 μg , optando por la utilización del quitosano como material de liberación.

Gracias a la presencia del grupo fluorescente GFP en las células C2C12, se pudo seguir el proceso de adhesión y proliferación celular durante el tiempo del ensayo. En la figura 55 se aprecian en las microfotografías de microscopía fluorescente invertida, diferentes especímenes en dos momentos del estudio (a los 4 y 7 días).

2.2. Determinación de la actividad metabólica (Ensayo de Alamarblue)

Se añadieron 40 μl del reactivo Alamarblue (Alamarblue® Cell Viability Reagent Invitrogen) directamente al medio de cultivo (10 μl por cada 100 μl de medio celular), se incubó a 37°C , durante 1 hora 30 minutos en oscuridad y se realizó la lectura de fluorescencia (longitud de onda de excitación 570 nm y de emisión 590 nm). Esta lectura se realizó a lo largo de 7 días para las células C2C12 y de 14 días para las MC3T3-E1, ya que estas últimas tienen un crecimiento más lento.

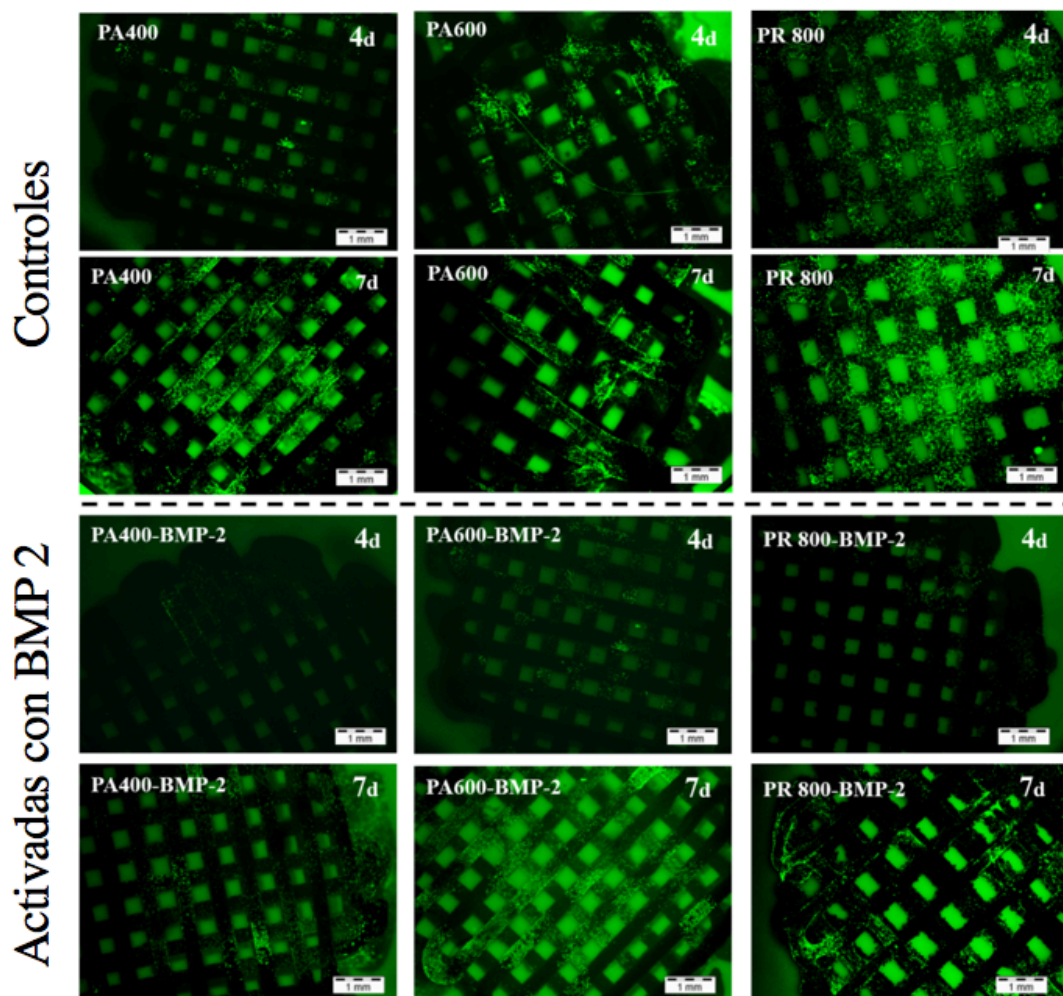


Figura 55. Evaluación de la adhesión y proliferación de C2C12GFP a los 4 y 7 días de cultivo.

2.3. Determinación de la actividad ALP (Ensayo de diferenciación)

La enzima fosfatasa alcalina es un indicador temprano de la diferenciación ósea. La actividad de esta enzima se determinó y cuantificó de manera colorimétrica, empleando un sustrato que, tras la acción de la enzima, da lugar a un producto de intenso color amarillo. Para la realización del ensayo, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron los pocillos con PBS para eliminar los posibles restos de proteínas del suero fetal bovino.

Se añadieron 100 μ L de buffer de lisis a cada pocillo (Tris pH 6,8 50 mM, Tritón X-1000 1%, $MgCl_2$ 2 mM) y se realizaron 3 ciclos de congelación-descongelación. Se separaron 10 μ L del lisado celular, por triplicado, y se añadieron 100 μ L de buffer

sustrato (50 μ L de p- nitrofenilfosfato y 50 μ L del buffer 2-amino-2-metil-1-propanol). Tras 15 minutos de incubación a 37 °C, la reacción se paró con 100 μ L de NaOH 0,5 M y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Biotek FL-600).

2.4. Tinción del citoesqueleto celular mediante inmunocitoquímica directa

Tras el cultivo celular los filmes sembrados fueron fijados con paraformaldehído 4% (PFA) durante 10 minutos. Después de varios lavados con PBS, se añadió Tritón X-100 al 0,1% en PBS (3 minutos en oscuridad), se lavó de nuevo con PBS y se añadió el reactivo de Actina, siguiendo las indicaciones del protocolo comercial (Texas Red -X-Phalloidin, Molecular Probes). Trascorridos 20 minutos de incubación en oscuridad a temperatura ambiente se retiró el reactivo de actina, se realizaron dos lavados consecutivos con tampón PBS y las células se observaron mediante microscopía de fluorescencia (Olympus IX51 microscope, filtro TRICT).

Se empleó como tinción de contraste el reactivo de Hoescht (tinción del DNA, Molecular Probes) añadiendo 5 μ L junto con el reactivo de actina en PBS.

2.5. Contenido total de proteínas mediante el ensayo de Bradford

El contenido total de proteínas en cada ensayo se determinó por el método MicroBradford (BioRad). Este ensayo se basa en la afinidad del colorante azul de Coomassie G250 por las proteínas y se utiliza para cuantificar la cantidad de proteínas mediante determinación de la Absorbancia a 590 nm. Para ello se retiró el medio de cultivo, se realizaron dos lavados de PBS de 200 μ L eliminando así las proteínas del medio y se añadieron 100 μ L de buffer de lisis a cada pocillo (Tris pH 6,8 50 mM, Tritón X-1000 1%, MgCl₂ 2 mM).

Después de realizar tres ciclos de congelación-descongelación para conseguir la ruptura de la membrana celular y la consiguiente liberación del contenido

citoplasmático al medio, se separaron 10 μL del lisado celular, por triplicado, y se adicionaron 60 μL de reactivo Bradford y 230 μL de agua destilada. Se incubó durante 15 minutos y se determinó la Absorbancia (Abs) a 590 nm empleando un lector de placas (Biotek FL-600).

2.6. Estudio Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El estudio de las muestras cultivadas se llevó a cabo mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) Philips XL-30, con emisión termoiónica gracias a un filamento de wolframio, utilizando un potencial acelerador de 20 kV (Figura 56). Este equipo está también provisto de un analizador EDAX DX-4 de espectroscopia de energía de rayos X dispersados que permite el análisis semicuantitativo de la composición química.

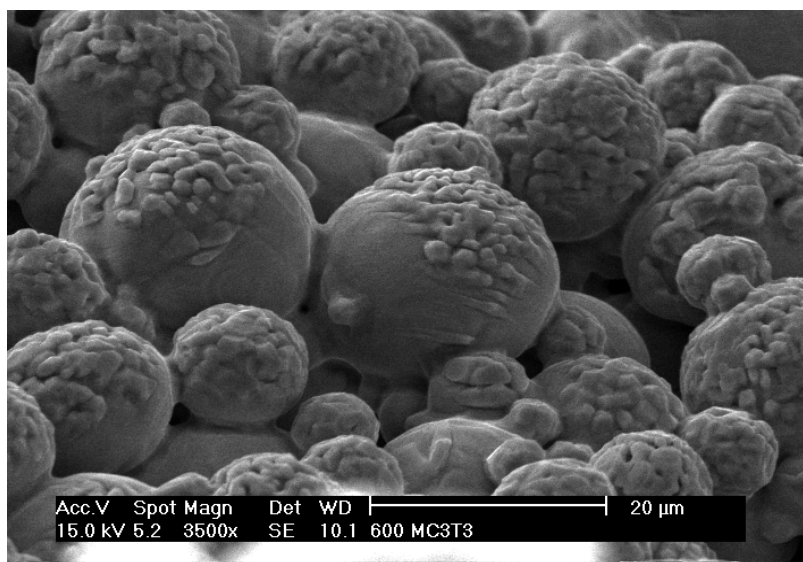


Figura 56: Imagen SEM a 3500 aumentos del implante PA600.

3. ESTUDIO IN VIVO

3.1. Diseño del estudio

Como se desarrollará más adelante en los resultados, al no apreciar diferencias significativas tanto en la adhesión como en la proliferación celular en las tres muestras analizadas en el estudio in vitro, se decidió realizar un estudio in vivo planteando la hipótesis nula de que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tipos de implantes.

El modelo animal que se diseñó fue el considerado por los autores de menor nivel de sensibilidad neurovegetativa, que permitía alcanzar los objetivos, siendo aprobado por un comité ético de investigación externo (Universidad Autónoma de Madrid) y otro comité interno (Instituto de Investigación 12 de Octubre).

Para abordar los objetivos propuestos en este proyecto, se revisó la literatura y optó por realizar los experimentos en conejos machos de raza neozelandesa adultos, ya que eran los que mejor se adaptaban a las condiciones y presupuesto del estudio. Los conejos fueron intervenidos y mantenidos en el estabulario del Instituto de Investigación 12 de Octubre con el fin de controlar diaria y estrechamente su estado (Figura 57).



Figura 57: especímenes de conejo neozelandés con los que se realizó el estudio.

En la literatura existen numerosos protocolos para la creación de defectos críticos en hueso en la experimentación *in vivo*, principalmente en calota, huesos largos y mandíbula. La creación de defectos críticos en calota es un excelente modelo de regeneración ósea ya que los implantes a ese nivel no son sometidos a cargas y son fácilmente accesibles, pero tiene una alta morbilidad al estar en relación con posibles lesiones a nivel del sistema nervioso central (Schmitz & Hollinger, 1986).

Se diseñó un estudio experimental *in vivo* basándonos en la literatura facilitada con un nivel α de 0.05 y poder estadístico del 80% (programa estadístico STATA versión 10). Se conformaron tres grupos de conejos ($n=9$), uno por tipo de implante desarrollado, colocándose en cada conejo dos implantes idénticos (figura 58). El modelo animal que se diseñó fue el considerado por los autores de menor nivel de sensibilidad neurovegetativa, que permitía alcanzar los objetivos, siendo aprobado por un comité ético de investigación externo (Universidad Autónoma de Madrid) y otro comité interno (Instituto de Investigación 12 de Octubre).

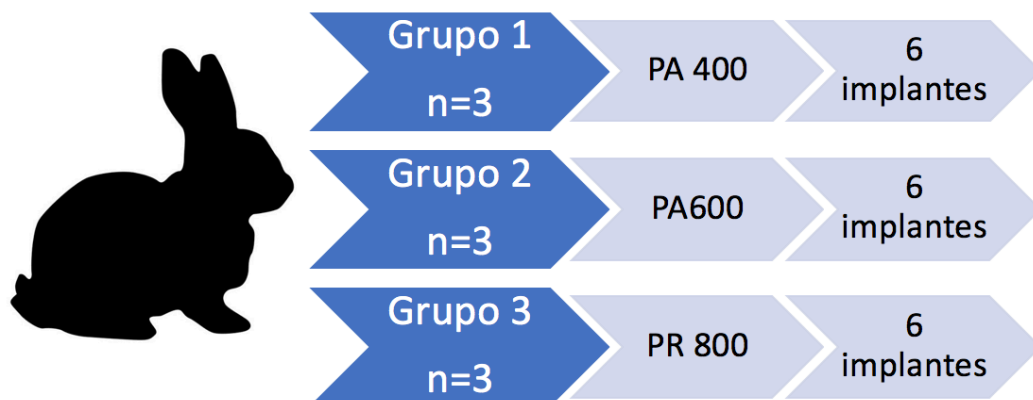


Figura 58: Esquema de la distribución del estudio.

El estudio se dividió en tres fases:

- Primera fase: en esta fase inicial se procedía a la implantación del primer implante a nivel fronto-parietal.

- Segunda fase: se realizó la reintervención a las seis semanas, donde se implantó el segundo implante justo posterior al previo.
- Tercera fase: finalmente una tercera cirugía en la cual se procedió a la retirada de ambos implantes y al sacrificio del animal.

Se decidió seguir este esquema temporal, ya que consideramos que el implantar los dos implantes en un primer tiempo hubiera supuesto mayor morbilidad a los conejos al tener que realizar la retirada de los dispositivos en dos tiempos distintos.

En la figura 59 se realiza un esquema del proceso secuencial que se llevó a cabo para la implantación y posterior retirada de los implantes en la calota de los conejos.

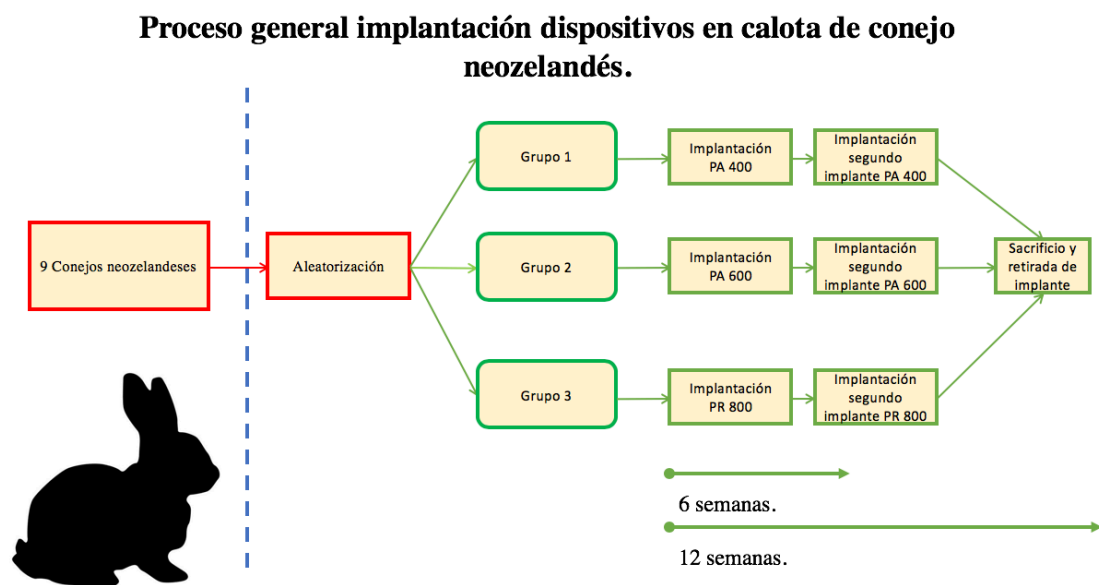


Figura 59: esquema del proceso general de implantación y retirada de los dispositivos en la calota de los conejos.

3.2. Estudio experimental

A. Primera fase:

Se procedió a la inducción anestésica de los conejos, utilizando Ketamina, Acepromacina y Atropina. El mantenimiento intraoperatorio se realizó con Isoflurane.

Se rasuró la región frontoparietal de los animales y se realizó la desinfección del campo quirúrgico con Clorhexidina 2%. Los implantes fueron esterilizados mediante rayos gamma de manera previa a la cirugía.

Basándonos en el modelo validado de percusión lateral por fluido (MacIntosh, 1989) se realiza una incisión entre ambos conductos auditivos externos y una descarga entre las cavidades orbitarias en forma de T con un bisturí del nº15. La disección de la región frontoparietal fue subperióstica siendo los límites anatómicos:

- anterior: reborde supraorbitario bilateral.
- posterior: occipucio.
- lateral: conductos auditivos externos.

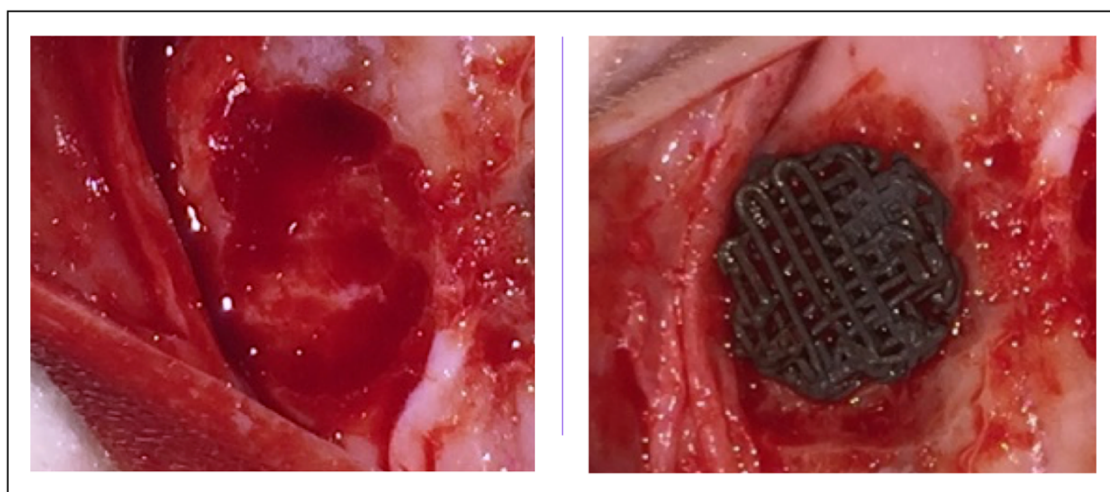


Figura 60: En la imagen izquierda se aprecia el defecto parietal creado. En la imagen derecha, se muestra la implantación del implante en el defecto crítico creado a nivel parietal.

Se creó un defecto parietal según los estudios de Kramer (Kramer, Killey, & Wright, 1968) al lado derecho de la línea media (diámetro 15mm y profundidad 3mm) usando una trefina dental de alta velocidad (Trefinas C.A. SSt THOMAS) con irrigación para evitar necrosis ósea.

En el defecto se procedió a la colocación de los implantes porosos que se habían asignado aleatoriamente a cada conejo (Figura 60). Cada uno de los conejos durante la intervención fue localizado con la implantación de un chip subcutáneo de reconocimiento. El cierre del abordaje se realizó en un solo plano con sutura reabsorbible (Vicryl 3.0).

Durante la primera semana tras la intervención se realizó una revisión diaria del estado de los conejos los cuales fueron alojados en el estabulario del Instituto de Investigación 12 de Octubre. Se prestó una especial atención al estado de la herida quirúrgica para evitar la formación de hematoma, o bien la infección de la misma.

Se realizó un estricto seguimiento del estado general del animal, prestando atención a la pérdida de peso del animal, deshidratación o fiebre. Durante esta primera semana ninguno de los conejos presento ninguna complicación postoperatoria. Una vez superado este periodo las revisiones se realizaron de manera semanal.

B. Segunda fase:

A las seis semanas tras la primera cirugía se procedió a la misma técnica descrita anteriormente. Se realizó una reapertura objetivando ya a las seis semanas de manera intraoperatoria una correcta osteointegración del implante en el defecto frontoparietal de todos los conejos, sin movilidad del mismo a la presión y objetivando crecimiento óseo por aposición (Figura 61).

Se creó un defecto parietal, justo posterior a los previos. Nuevamente fue en el lado derecho donde se depositó un implante poroso de las mismas propiedades del que se había insertado seis semanas antes.

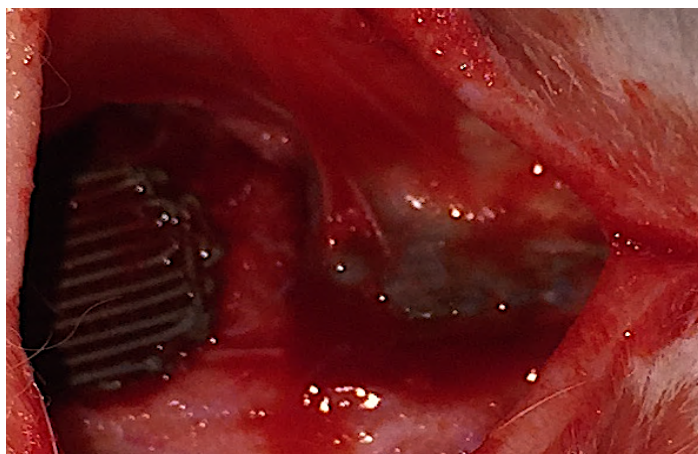


Figura 61: a la derecha de la imagen se objetiva el primer implante colocado hace 6 semanas, a la izquierda el segundo implante implantado en este segundo tiempo.

Se procedió al cierre en un solo plano con sutura reabsorbible 3.0. Las pautas postquirúrgicas fueron las mismas que en la primera cirugía, así como el control de los conejos. Ninguno de los animales presentó complicaciones tras la segunda intervención.

C. Tercera fase:

Finalmente, a las 12 semanas se procedió a la reapertura de la incisión. Se objetivó correcta osteointegración de ambos implantes en todos los conejos. Se procedió a la retirada de las esponjas de titanio en bloque junto al hueso frontoparietal. La pieza incluía ambos rebordes supraorbitarios, cisura frontotemporal, cisura parietotemporal y cisura parietooccipital.

Una vez finalizada la cirugía se procedió al sacrificio de los animales sin llegar a despertarlos (Figura 62). Inicialmente se inducía una sedación profunda para posteriormente realizar una sobredosis anestésica con Tiopentato sódico como procedimiento que evita el sufrimiento innecesario del animal, llevado a cabo por veterinarios cualificados. Todas las intervenciones y el seguimiento de los animales fueron realizados por los dos mismos cirujanos. Las muestras fueron remitidas al Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) perteneciente al Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), para su estudio radiológico y posterior procesado para estudio anatomopatológico.

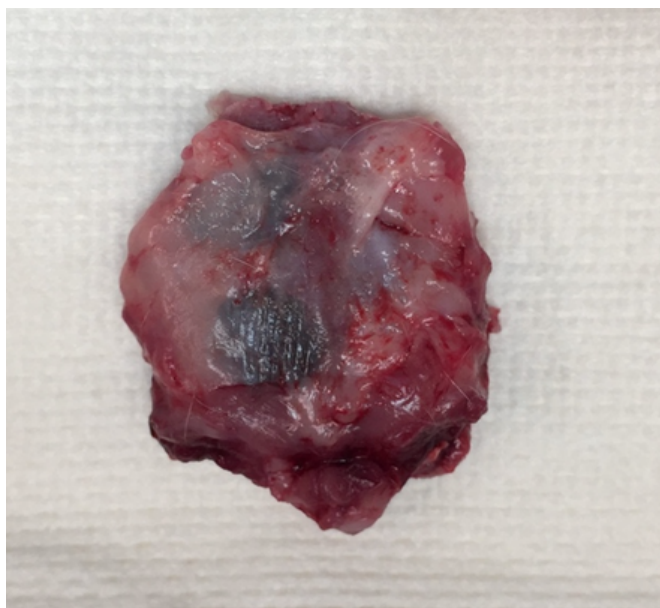


Figura 62: calota de conejo con ambos dispositivos integrados.

3.3. Tomografía Computarizada (SPECT-CT)

Las muestras se derivaron al Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), donde se realizó un estudio con técnica de SPECT-CT para valorar la correcta osteointegración de los implantes.

Las imágenes de las muestras se adquirieron con el equipo nanoSPECT-CT de MEDISO (Figura 63). Las imágenes han sido tratadas con posterioridad con el software de imagen Vivoquant 2.0 (Invicro) y en el visor DICOM Horos Project.

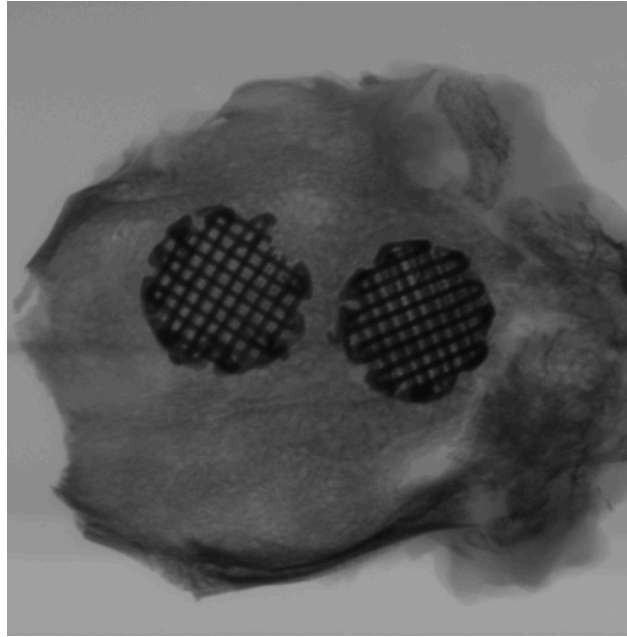


Figura 63: radiografía de la muestra de calota con los dos implantes.

El análisis consistió en el siguiente protocolo:

1. Se crearon dos regiones de interés o ROIs (Region Of Interest), una por cada implante en cada una de las muestras.
 - Implante 1. En color verde (más frontal). Se trata del dispositivo que llevaba doce semanas implantado.
 - Implante 2. En color rojo (más occipital). Se trata del dispositivo que llevaba seis semanas implantado.

Las ROIs se delimitaron a mano corte a corte en cada una de las muestras y seleccionando solo aquellos píxeles que correspondían ciertamente al implante (Figura 64).

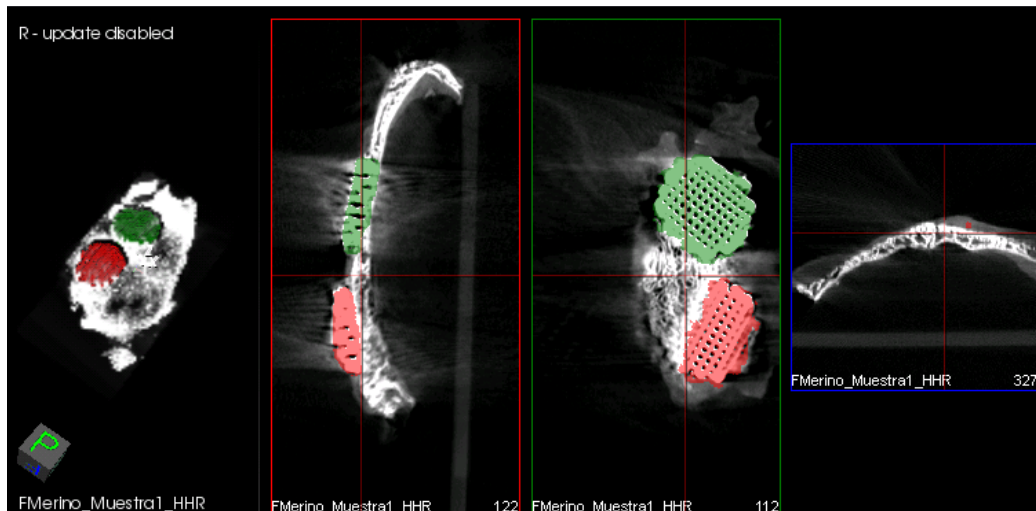


Figura 64: reconstrucción multiplanar de las muestras de calota de conejo con marcaje de las regiones de interés (ROIs) a estudio.

2. Se generaron las imágenes de los histogramas de densidades correspondientes a estas dos ROIs (Figura 65). Con estas imágenes podemos ser capaces de “interpretar” lo que ha sucedido con el implante en cada muestra a través de las diferentes densidades obtenidas.

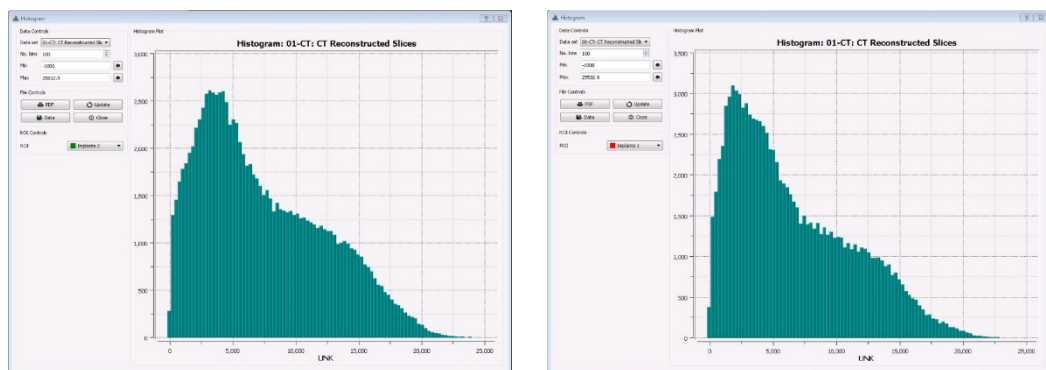


Figura 65: Histograma de densidades correspondientes a las dos ROIs.

3. Se generaron los archivos con los datos de los histogramas de densidades correspondientes a estas dos ROIs. Con estos archivos podremos

comparar la cantidad de píxeles de un determinado rango de densidad entre dos muestras con diferente tratamiento.

4. Dentro del dibujo de cada ROI con el programa visor de DICOM Horos, se estudió el volumen total de hueso (VTH), entendiendo este como el volumen total del implante incluyendo el hueso que ha crecido en su interior (Van der Stock y cols., 2013) (Figura 66).
5. Se estudió también el hueso generado alrededor del implante o volumen de hueso externo (VHE). El volumen se creó definiendo regiones de interés que ocupan el implante y el hueso neoformado alrededor del mismo y restando a este volumen el volumen total de hueso.

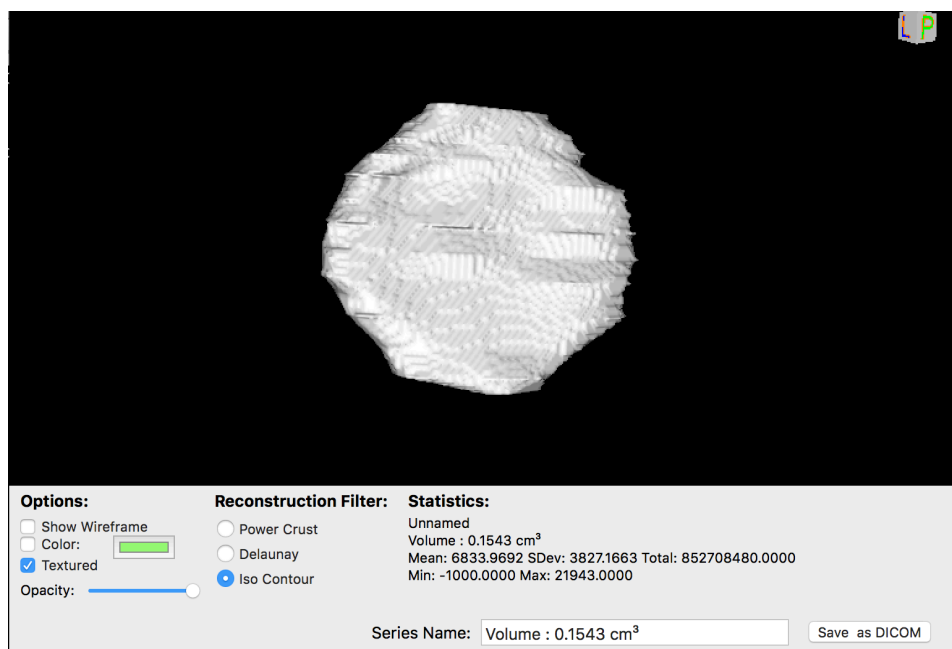


Figura 66: Cálculo del ROI y el volumen en el interior de este.

3.4. Tratamiento Histológico

El tratamiento histológico de las muestras se llevo a cabo también en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), a través de la técnica EXAKT.

EXAKT es un sistema de preparación de secciones histológicas que se utiliza para el estudio histológico de muestras que no pueden ser seccionadas por métodos tradicionales (parafina, OCT), tejidos mineralizados (como tejidos óseos y tejidos dentales) o muestras que contengan cualquier tipo de implante (metálico o no). En este ultimo caso, este sistema de preparación de secciones es especialmente interesante porque permite el estudio de la interfase entre tejido e implante.

El sistema EXAKT se basa en un procedimiento de corte y pulido. Una vez obtenida una sección lo suficientemente delgada, esta se puede teñir, pero siempre teniendo en cuenta que es el tipo de muestra el que determina el grosor final de pulido (para limitar la pérdida de información en la muestra por fricción en la fase de pulido fino) (Figura 67).

En general, las secciones de EXAKT tienen entre 5 y 50 micras, por lo que no son comparables con una sección de tejido incluido en parafina.

- Procesamiento de las muestras:

1. Fijación: las muestras fueron recepcionadas congeladas y se procedió a su fijación con formalina al 10%. El tiempo de fijación fue de 2 meses en agitación.
2. Deshidratación e Infiltración: se utilizó el equipo EXAKT-Unidad de Deshidratación e Infiltración 510.
3. Confección del bloque: los equipos utilizados fueron EXAKT-Lightpolymerization 520 y EXAKT- Block Driying 530.
4. Confección del sándwich: se utilizan los equipos EXAKT- Vacuum Adhesive Press 401 (prensador), EXAKT-Prensa Fotopegado 402 (fotopolimerizador/prensador) y EXAKT- Pulidora Micro 400CS Grinding System.

5. Corte del sándwich: se utilizó el equipo EXAKT- Cutting Grinding System (sierra de banda 400CS).
6. Pulido fino: se utiliza el equipo EXAKT- Pulidora Micro 400CS Grinding System.
7. Tinción: Se procedió a la tinción de las muestras con Hematoxilina-Eosina (Figura 68).

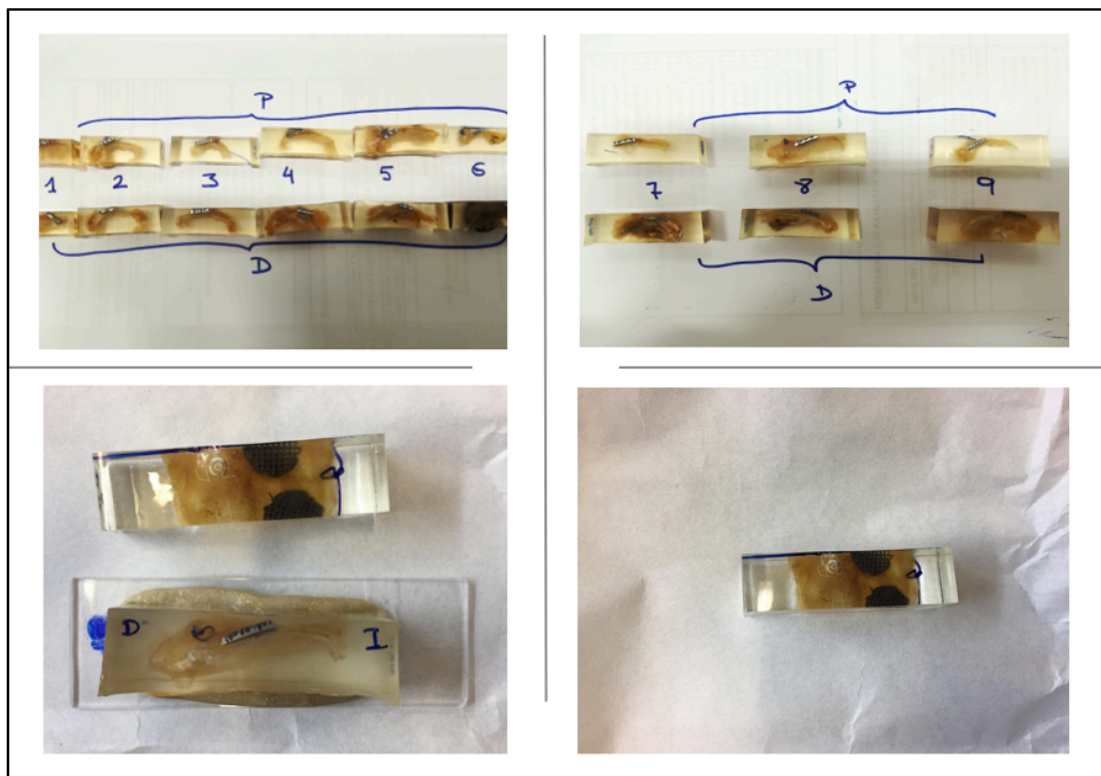


Figura 67: Bloques procesados por técnica EXAKT. En las imágenes superiores se valoran las 18 muestras que se obtuvieron. En las imágenes inferiores se pueden ver las muestras marcadas para identificarlas correctamente.

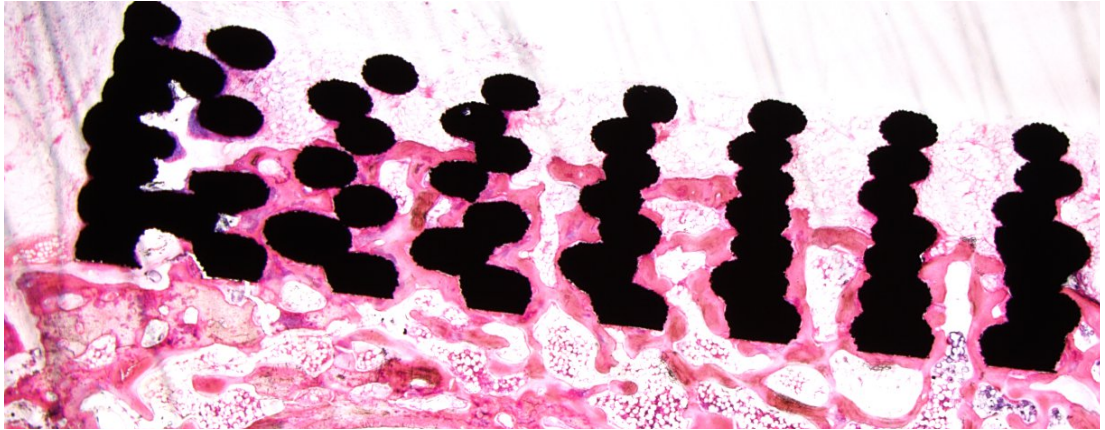


Figura 68: Imagen final de la muestra una vez realizada la tinción con Hematoxilina-Eosina a microscopía óptica.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se llevó a cabo un estudio experimental analítico, donde se realiza un estudio analítico prospectivo en el que hay seguimiento.

La recogida de datos es sistemática y está presente en todos los casos de la muestra. Las variables cualitativas fueron descritas con su distribución de frecuencias y las cuantitativas con medidas de tendencia central (media o mediana) y de dispersión (desviación estándar o rango intercuartílico).

Se ha evaluado la asociación entre las variables cuantitativas utilizando la técnica del Análisis de la Varianza para la comparación de Medias. En concreto usaremos un ANOVA de medidas repetidas, lo que en la literatura se conoce como un Modelo Mixto.

En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastó la hipótesis de homogeneidad de variancias. Se ha evaluado la existencia de factores modificadores del efecto sobre la hipótesis principal mediante el análisis bivariado, evaluando la homogeneidad de efectos mediante la prueba de Breslow-Day. Igualmente se evaluó el posible efecto confusor de las variables de la

muestra sobre la hipótesis evaluando el cambio de magnitud de efecto y las condiciones de variable confusora.

Se utilizó un error de tipo I o error a menor a 0,05. En la estimación de la reducción de riesgo se utilizó las recomendaciones de la guía STROBE. El análisis estadístico se ha realizado con el software SAS (Statistical Analysis System).

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. ESTUDIO IN VITRO

En este apartado se evaluará como afectan las características fisicoquímicas de los distintos implantes y su recubrimiento con BMP-2 a las propiedades de adherencia, proliferación y diferenciación celular sobre los mismos.

1.1. Determinación de la actividad metabólica (Ensayo de Alamarblue)

Nuestro primer objetivo era estudiar el comportamiento celular en los tres tipos de implantes de titanio diseñados por robocasting y si la presencia de BMP-2 tenía algún efecto sobre el crecimiento celular. Se utilizaron dos tipos celulares, la línea C2C12 y la MC3T3-E1.

Se pretende estudiar el efecto de los siguientes factores:

- i) Implante, entendemos por implante los tres tipos de dispositivos que dispusimos.
- ii) Activada, presencia o no de BMP-2 en el implante
- iii) Tiempo, se hicieron mediciones en distintos momentos de la actividad metabólica de las células C2C12 y MC3T3, que serán analizadas de forma independiente.

El objetivo del trabajo es determinar si los cambios en los niveles tanto del tipo de implante como en la activación de las BMPs implican valores distintos de actividad metabólica media. Además, interesa vigilar la evolución de la actividad metabólica a lo largo de los días.

Para cada tipo de célula utilizada tenemos seis cultivos sobre los que se han ensayado tres implantes distintos: PR800, PA600 y PA400. Además, se han estudiado dos tipos

de activaciones en las células: A (muestras activadas con BMP-2) y C (control, muestras no activadas con BMP-2) y se han tomado medidas repetidas a lo largo del tiempo (días): 1, 4 y 7 días para C2C12 y 4, 7 y 14 días para MC3T3.

Para el análisis de los datos utilizamos la técnica del Análisis de la Varianza para la comparación de Medias. En concreto usaremos un ANOVA de medidas repetidas, lo que en la literatura se conoce como un Modelo Mixto.

Hay que destacar en este caso que la presencia de 3 niveles en el factor implantes y 2 niveles en la activación implicaría un diseño factorial completo con 6 sujetos que son los que se disponen dado que no disponemos de réplicas.

Los factores implantes y activación son conocidos como factores intersujetos (between) que dividen la muestra en $6 = 3 \times 2$ grupos y a todos los sujetos se les realizan medidas repetidas en los días especificados, factor intrasujetos o de medidas repetidas (within).

La metodología estadística para aplicar es una comparación de medias siendo la hipótesis nula la ausencia de diferencias entre los niveles de cada factor: tipo de implante, activación y días. Rechazaremos la hipótesis nula cuando las diferencias entre las medias de cada grupo sean estadísticamente significativas (trabajando con un nivel de significación de $\alpha = 0.05$ aunque adjuntaremos siempre el valor del estadístico de contraste, el p-valor y la diferencia entre los efectos).

En la figura 69 se muestran los resultados de proliferación obtenidos mediante el ensayo de Alamarblue para el cultivo de células C2C12.

Cuando planteamos estadísticos descriptivos para cada grupo $3 \times 2 \times 3$, tenemos que la ausencia de réplicas nos impide calcular desviaciones típicas; para cada uno de los 18 grupos definidos obtenemos la actividad metabólica (media).

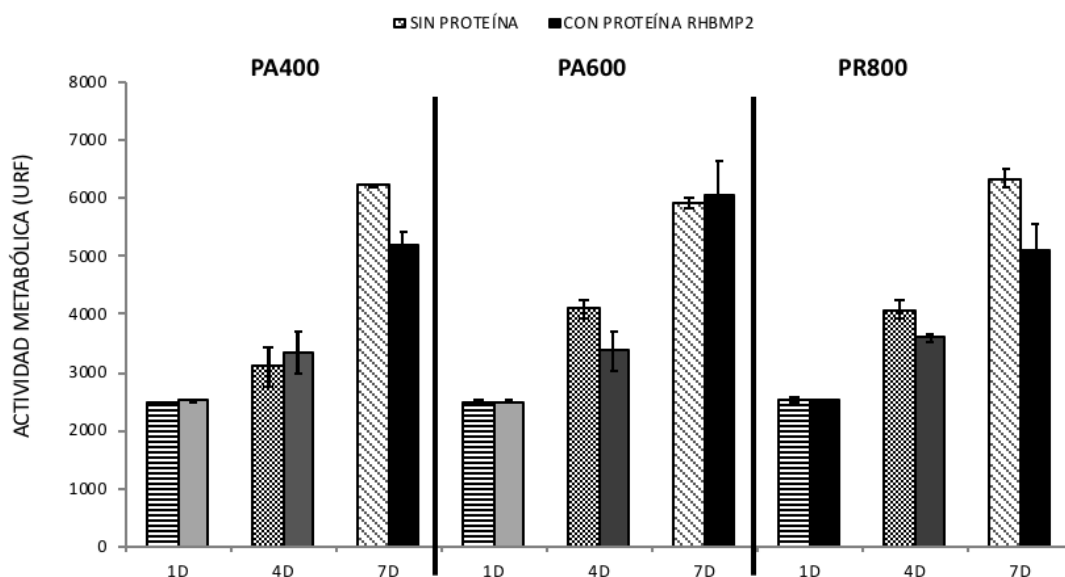


Figura 69: Resultados de proliferación y adhesión celular para las células C2C12. Se mide la actividad metabólica para los distintos tipos de implante con y sin proteína BMP-2. Las mediciones se hicieron a las 24h, a los 4 y 7 días del cultivo celular. Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia (URF).

Estos resultados los interpretamos observando que no hay diferencias significativas en la actividad metabólica entre los tres implantes ya que obtenemos un estadístico $F_{2,2} = 1,698$ y un p-valor 0.371 . Además, tampoco detectamos diferencias significativas en la actividad metabólica entre los dos niveles del factor activada ya que obtenemos un estadístico $F_{1,2} = 5.587$ y un p-valor 0.142 . En cambio, si que se detectan diferencias significativas en la actividad metabólica a lo largo del tiempo para cada tipo de implante, $F_{2,10} = 103.2$ y el p-valor $2.1e - 07$ en este caso resulta muy significativo.

Podemos representar gráficamente la evolución de la actividad metabólica a lo largo de los tres instantes de tiempo en los que se repiten las medidas (Figura 70). Las gráficas presentan en distintos paneles la actividad de las células Activadas y las de Control y en distintas líneas o trazos las tres puntas.

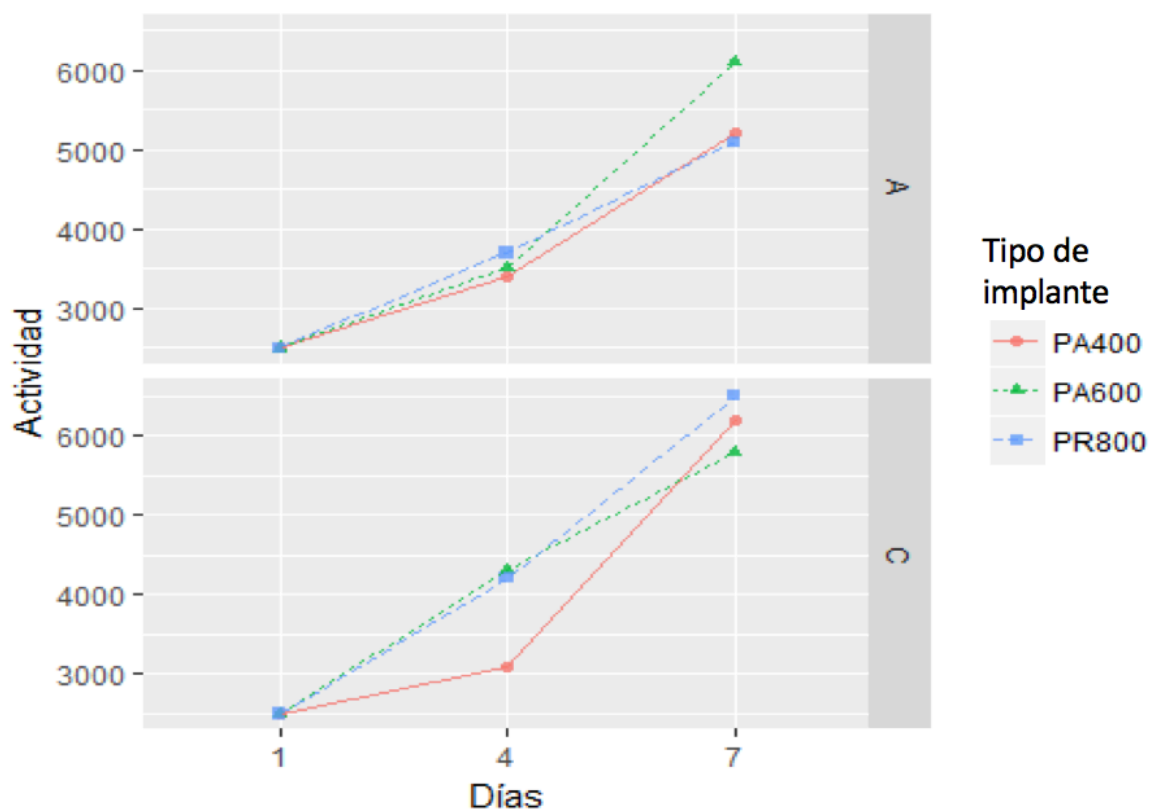


Figura 70: Gráfica de la evolución de la actividad metabólica. Se han tomado medidas repetidas a lo largo del tiempo (días): 1, 4 y 7 días para C2C12. En la gráfica superior podemos observar la evolución de la actividad metabólica en las diferentes mediciones según el tipo de implante en la muestra activada. En la gráfica inferior tenemos las mismas mediciones para las muestras control o no activadas.

Se puede comprobar cómo la hipótesis de igualdad de varianzas entre los niveles de implante y de activada no se puede rechazar ya que en ambos casos se obtienen p-valores muy altos.

Como conclusión podemos ver como los cambios en implante y en activada no influyen en la actividad metabólica, mientras que el tiempo (1, 4 y 7 días) si que presenta una influencia ascendente en la actividad metabólica observada.

La actividad metabólica de las células MC3T3 no se determinó a las 24h porque son células con una velocidad de crecimiento menor que las C2C12GFP y son más sensibles al ensayo de Alamarblue, pudiendo interferir dicho experimento en su proceso de adhesión y proliferación sobre las esponjas de titanio. En este caso se midió la actividad

metabólica a 4, 7 y 14 días. En la figura 71 se muestran los resultados de proliferación y adhesión celular.

Para las células MC3T3 los datos experimentales fueron recogidos en los seis sujetos y en los tres días para cada sujeto. El cálculo de los estadísticos descriptivos para cada grupo: 3x2x3 es similar al del C2C12, para cada uno de los 18 grupos definidos obtenemos la actividad metabólica (media).

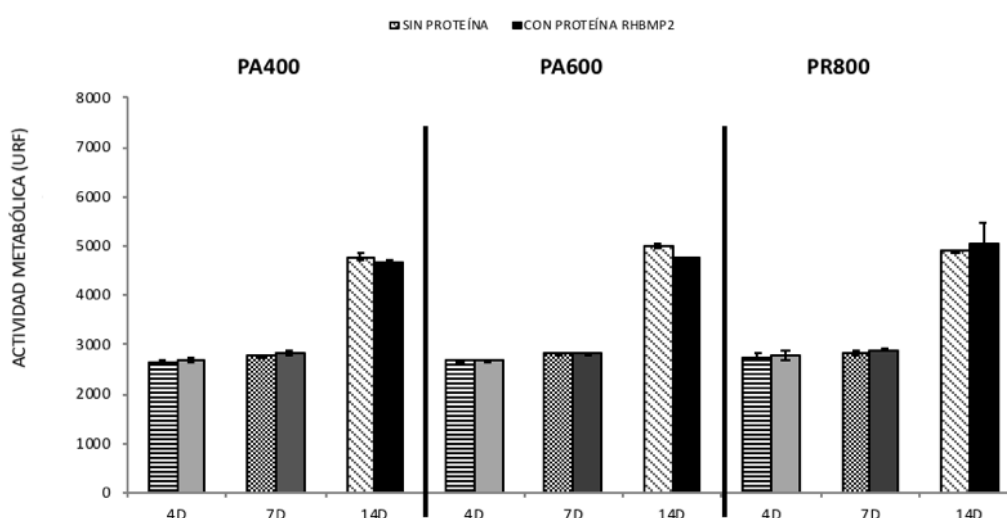


Figura 71: Resultados de proliferación y adhesión celular para las células MC3T3. Se mide la actividad metabólica para los distintos tipos de implante con y sin proteína BMP-2. Las mediciones se hicieron a los 4, 7 y 14 días del cultivo celular. Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia (URF).

Representamos gráficamente la evolución de la actividad metabólica a lo largo de los tres instantes de tiempo en los que se repiten las medidas. Nuevamente las gráficas presentan la actividad de las células Activadas y las de Control y en distintas líneas o trazos los tres implantes (Figura 72).

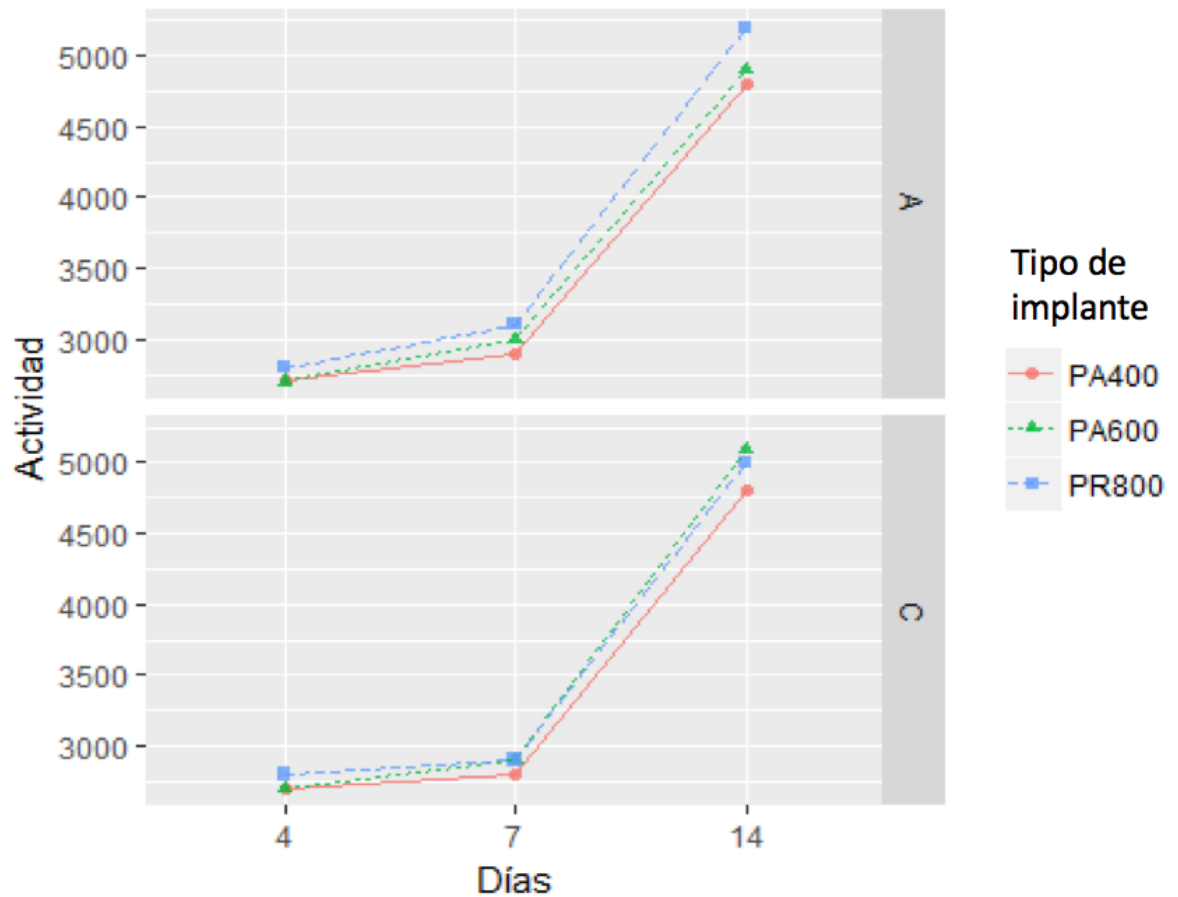


Figura 72: Se han tomado medidas repetidas a lo largo del tiempo (días): 4, 7 y 14 días para MC3T3. En la gráfica superior podemos observar la evolución de la actividad metabólica en las diferentes mediciones según el tipo de punta utilizada en la muestra activada. En la gráfica inferior tenemos las mismas mediciones para las muestras control o no activadas.

Planteando el modelo mixto con dos factores intersujetos o between (3 y 2 niveles respectivamente) y un factor intrasujetos o within (3 repeticiones de medidas), estos resultados los interpretamos observando que no hay diferencias significativas en la actividad metabólica entre los tres implantes ya que obtenemos un estadístico $F_{2,2} = 4.789$ y un p-valor 0.173. Además, tampoco detectamos diferencias significativas en la actividad metabólica entre los dos niveles del factor activada ya que obtenemos un estadístico $F_{1,2} = 0.842$ y un p-valor 0.456. En cambio, si que se detectan diferencias significativas entre las repeticiones de las medidas de actividad metabólica a lo largo del tiempo, $F_{2,10} = 1330$ y el p-valor $7.37e - 13$ en este caso resulta muy significativo.

Se puede comprobar cómo la hipótesis de igualdad de varianzas entre los niveles de implantes y de activada no se puede rechazar ya que en ambos casos se obtienen p-valores muy altos.

Como conclusión podemos ver, que para las células MC3T3, los cambios en implantes y en activada no influyen en la actividad metabólica. Mientras que el tiempo sí que presentan una influencia ascendente en la actividad metabólica observada.

1.2. Estudio de la capacidad de diferenciación ósea en los implantes de titanio mediante determinación de la actividad fosfatasa alcalina (ALP) (Ensayo de diferenciación)

La fosfatasa alcalina es un indicador de diferenciación ósea en los estadios de diferenciación preosteoblástica y osteoblástica. Las células C2C12 son capaces de diferenciarse bajo la acción de la rhBMP-2 a linaje osteoblástico, mostrando como consecuencia de este proceso una actividad ALP importante, característica de células osteoblásticas.

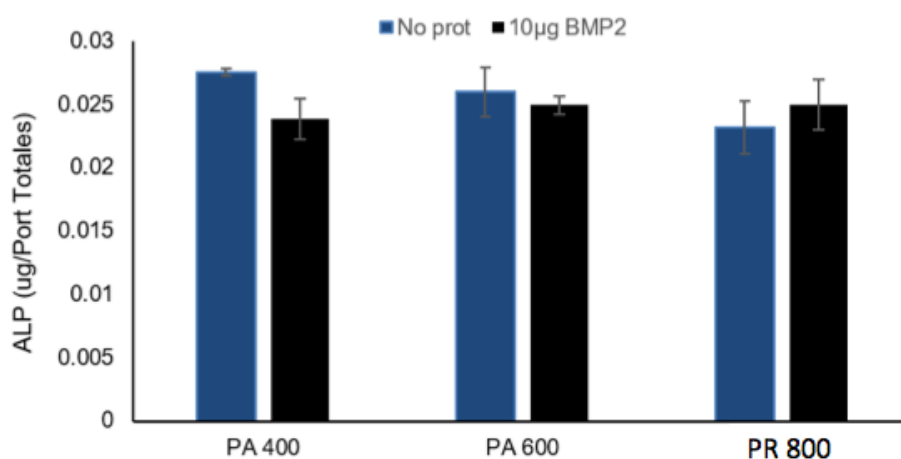


Figura 73: Medición de ALP en el cultivo de células C2C12. Se representan los resultados del ensayo de ALP a los 4 días de cultivo.

En el caso de la detección de la actividad de fosfatasa alcalina el valor mayor fue registrado por la muestra PA400. Se objetivaron valores más altos en las muestras PA 400 y PA 600 no activadas con BMP-2 frente a las activadas. En el caso de los implantes PR 800, el valor de ALP fue mayor en las muestras activadas con BMP-2 frente a las no activadas (Figura 73).

Estos datos bajos de ALP, junto al no presentar niveles más elevados en las muestras activadas con BMP-2 sugiere que el recubrimiento de quitosano con BMP2 no fue efectivo, es decir, cuando se activaron las proteínas el film no se adhirió correctamente a la superficie del implante, y en contacto con el medio se despegó, perdiéndose la proteína que iba en él.

Respecto a la detección de la fosfatasa alcalina en la línea MC3T3, la muestra con mayor nivel de fosfatasa alcalina fue PA 400 no activada con BMP-2 (Figura 74). Las muestras no activadas con BMP-2 obtuvieron valores más altos de fosfatasa alcalina en todas las muestras, aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de implante ni en la presencia o no de BMP-2.

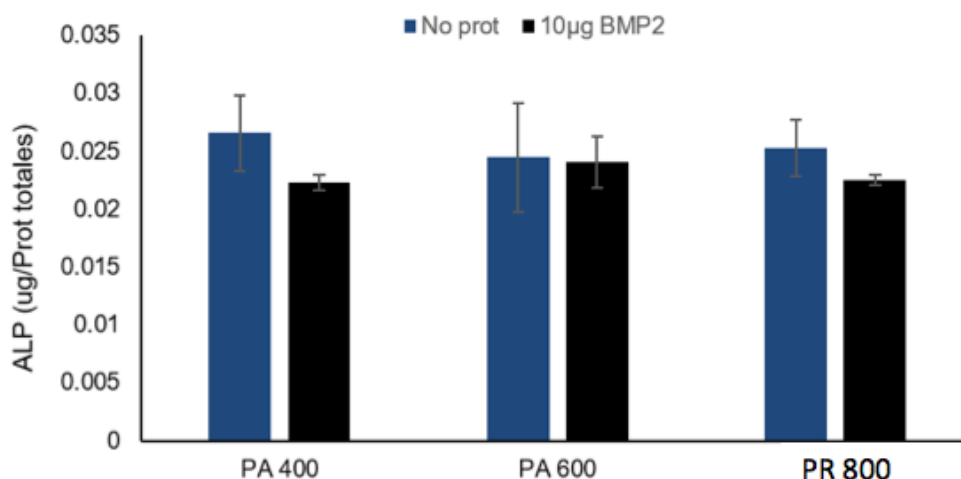


Figura 74: Medición de ALP en el cultivo de células MC3T3. Se representan los resultados del ensayo de ALP a los 4 días de cultivo.

Los resultados son muy similares a los obtenidos en el cultivo de C2C12, entendemos que esto se asocia al despegamiento del film de quitosano, por lo que no había proteína adherida, así que los preosteoblastos MC3T3 no pudieron diferenciarse a osteoblastos.

1.3. Estudio de la morfología celular en los implantes de titanio mediante tinción del citoesqueleto celular por inmunocitoquímica directa

El Hoechst es un colorante fluorescente de ADN empleado en la microscopía de fluorescencia, por su capacidad de tinción de ADN se emplea para visualizar núcleos y mitocondrias. El Texas Red-X-Phalloidin se trata de un reactivo de actina con el que se permite observar a microscopía de fluorescencia el citoesqueleto celular.

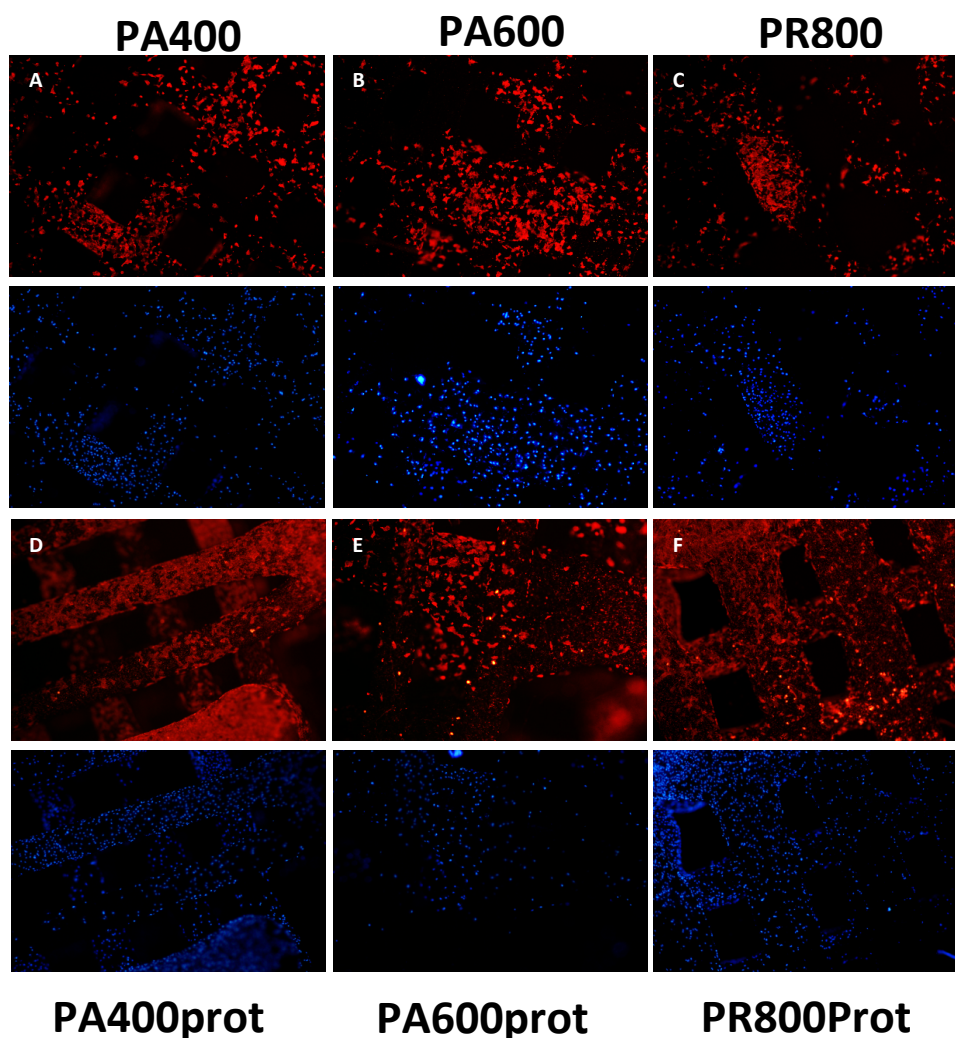


Figura 75: Evaluación del citoesqueleto celular de las células MC3T3.

En la figura 75 se puede objetivar como las células se adhirieron y proliferaron en las muestras. Se expone la tinción del núcleo celular (Hoechst) y el citoesqueleto de las células (Texas Red Phalloidin). En las imágenes A, B y C valoramos muestras no activadas con BMP-2 a los 14 días de cultivo. En las imágenes D, E y F se presentan muestras activadas con BMP-2 a los 14 días de cultivo. En la parte superior de la imagen se aprecia el citoesqueleto celular con la tinción Texas Red Phalloidin con gran afinidad por la actina. En la parte inferior de las imágenes vemos el núcleo celular con la tinción de Hoechst.

En esta imagen se observa la presencia de fibras de actina asociadas a las células de la muestra. El citoesqueleto de actina juega un papel importante en la contractilidad celular, proveyendo de fuerza para un gran número de funciones como son la adhesión celular, la migración o la morfogénesis. No hubo cambios significativos en la morfología celular en función de la porosidad del implante utilizado.

Las imágenes mostraron correcta adhesión de las células al implante, tanto en su superficie como en el interior de los poros, mostrando crecimiento en toda la muestra. No se objetivaron diferencias para la adhesión y crecimiento de las células en función de la porosidad del implante.

1.4. Estudio de la proliferación celular en los implantes de titanio mediante determinación del contenido total de proteínas

La determinación del contenido total de proteínas se utiliza para cuantificar la proliferación celular. Para ello, se han desarrollado diferentes métodos para cuantificar el número de proteínas totales, en nuestro caso se midió mediante el ensayo de Bradford.

Como se puede valorar en la figura 76, en el cultivo de células C2C12 los valores de proteínas totales fueron similares en todas las muestras. La mayor concentración de proteínas se objetivó en las muestras PR 800 no activadas con BMP-2. Llama la atención como se observó una disminución del contenido total de proteínas en aquellas muestras activadas con BMP-2 en las muestras PA 400 y PR 800 frente a las muestras

no activadas. En las muestras PA 600 aquellas activadas con BMP2 si presentaron una mayor concentración de proteínas frente a las no activadas. De igual manera, no existieron diferencias estadísticamente significativas a los 4 días en ninguna de las muestras.

Respecto al cultivo de células MC3T3 los valores de proteínas totales también fueron similares en todas las muestras (Figura 77). La mayor concentración de proteínas en este caso se midió en las muestras PA 600 no activadas con BMP-2. Al igual que en las células C2C12, se aprecia como las muestras no activadas para los implantes PA600 y PR 800 tuvieron valores más altos que los mismos implantes activados con BMP-2, solamente en el caso de los implantes PA 400, las muestras activadas con BMP-2 tuvieron niveles más altos que las muestras no activadas. De igual manera, no existieron diferencias estadísticamente significativas a los 4 días en ninguna de las muestras.

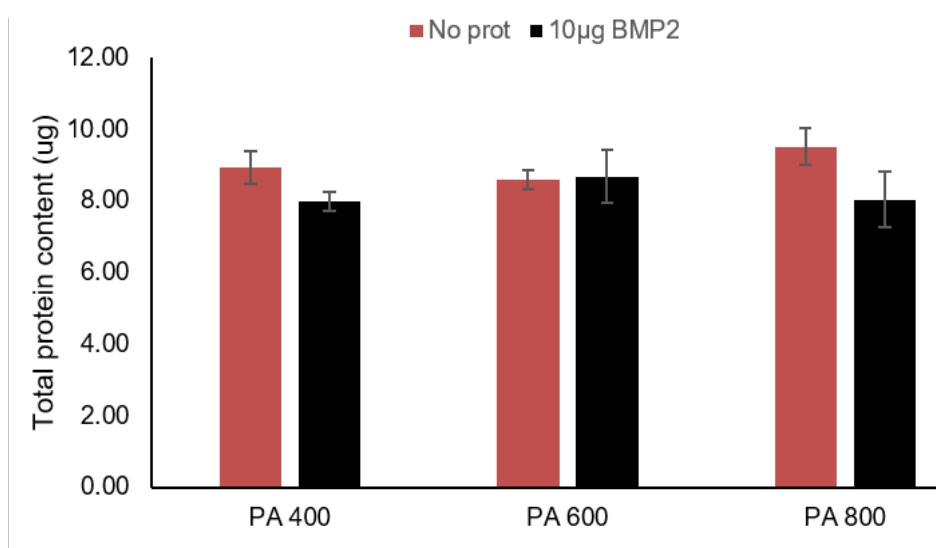


Figura 76: Medición de proteínas totales en el cultivo de células C2C12. Se representa los resultados obtenidos correspondientes al ensayo de Bradford a los 4 días de cultivo.

Esta escasa diferencia entre las muestras activadas y no activadas con BMP-2, vuelven a poner en relevancia que no existió una buena adherencia de las proteínas a los implantes.

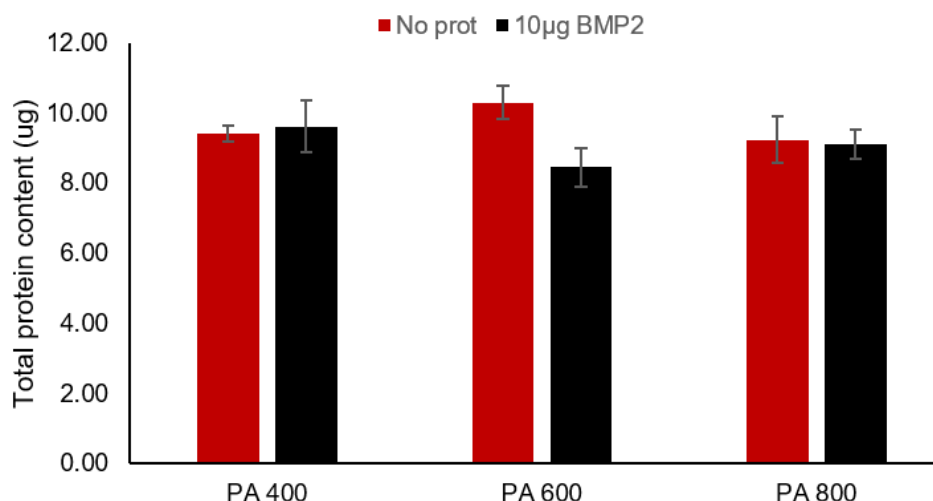


Figura 77: Medición de proteínas totales en el cultivo de células MC3T3. Se representa los resultados obtenidos correspondientes al ensayo de Bradford a los 4 días de cultivo.

1.5. Estudio de la morfología celular en los implantes de titanio mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La Microscopía Electrónica de Barrido, a través de la interacción de los electrones con la materia, permite obtener imágenes de una gran resolución. En nuestro caso, el estudio por SEM de las muestras tras el estudio in vitro permitió la observación de la morfología de la matriz extracelular y de las células a través del implante poroso (Hrabe y cols., 2013).

En todas las muestras se objetivó crecimiento celular a los 14 días. Un ejemplo es la figura 78, donde se observan dos muestras, la superior se trata de una muestra PA 600 con cultivo de C2C12 no activada con BMP-2 (Imagen A. a 500 aumentos e imagen B. a 1200), mientras que la inferior es una muestra PR 800 con cultivo de C2C12 activada con BMP-2 (Imagen C. a 500 aumentos e imagen D. a 800). En ambos casos se objetiva la correcta adhesión celular a la superficie del implante y el crecimiento de las líneas celulares tanto con y sin activación de la proteína BMP-2.

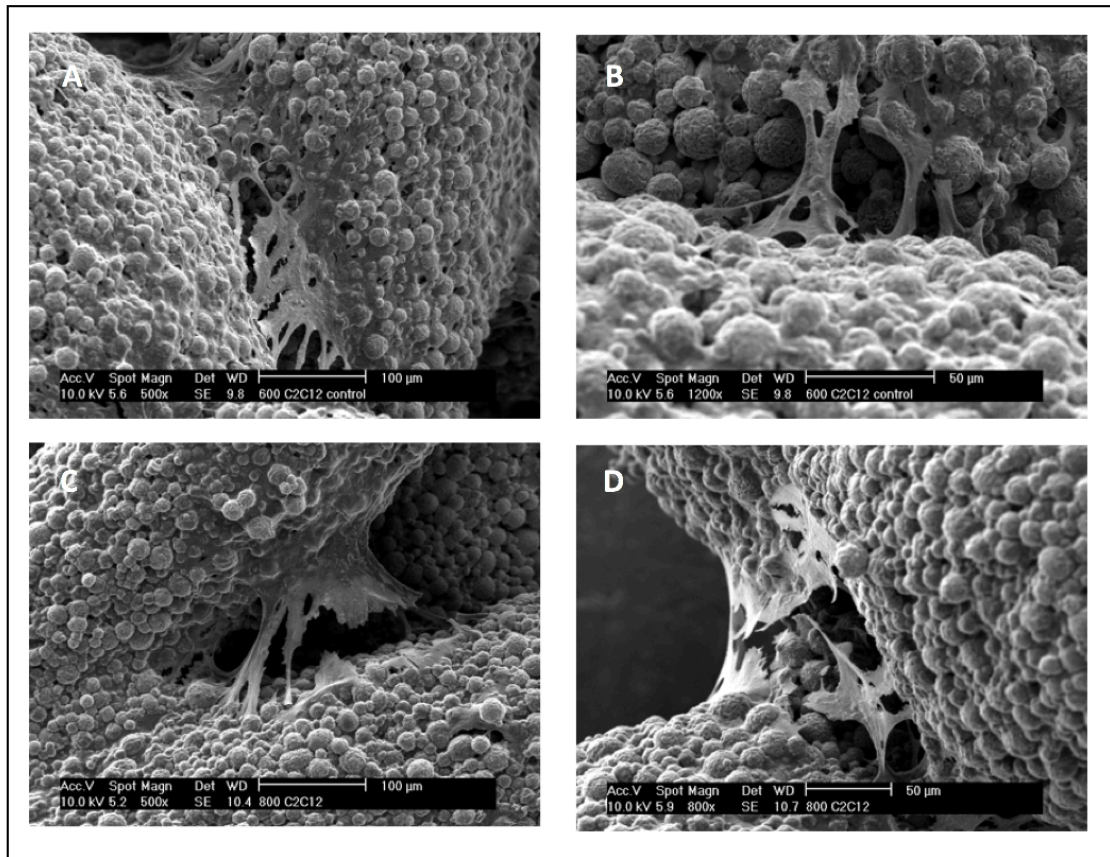


Figura 78: Imágenes de SEM tomadas en modo SE de implantes tras cultivo con células C2C12.

En la figura 79 se muestran dos implantes PA 600 con cultivo de células MC3T3. En el lado izquierdo se trata de muestras no activadas con MC3T3 a 1200 aumentos (A y B), mientras que en el lado derecho son células MC3T3 activadas con BMP-2 a 800 aumentos en la imagen superior (B) y 1200 en la imagen inferior (D). En ambos casos se objetiva la correcta adhesión celular a la superficie del implante y el crecimiento de las líneas celulares tanto con y sin activación de la proteína BMP-2.

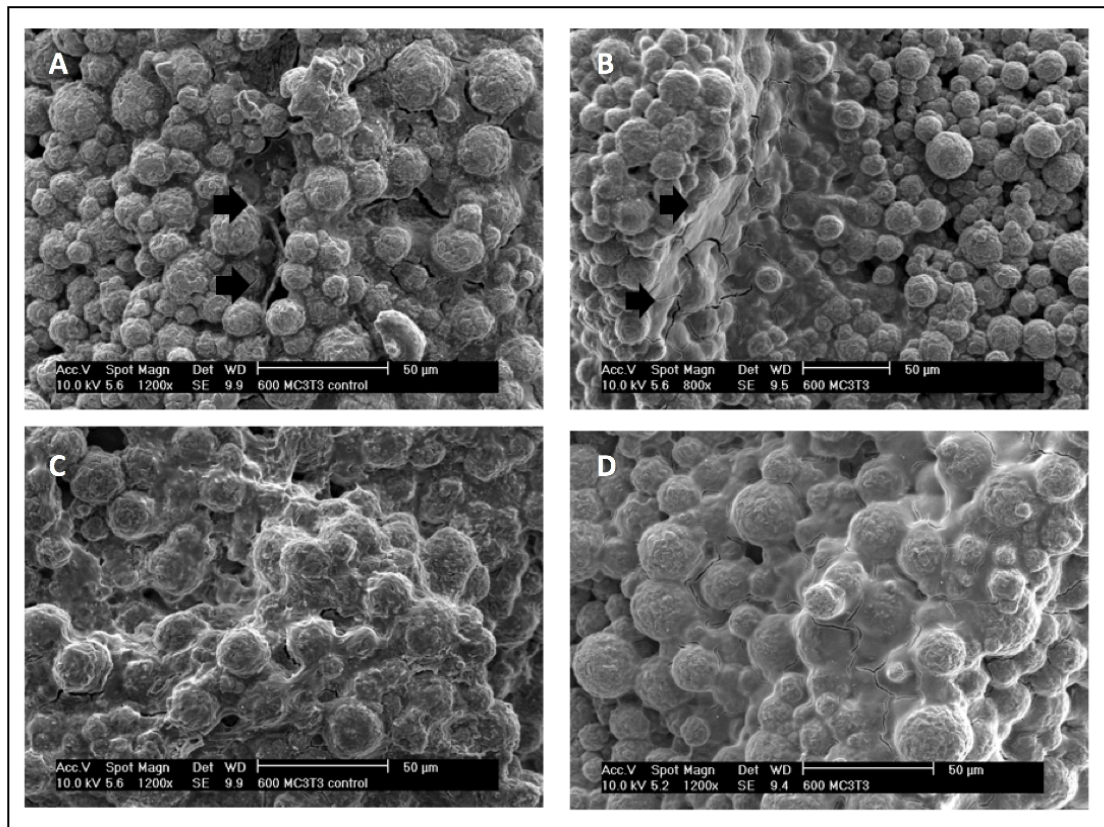


Figura 79: Imágenes de SEM tomadas en modo SE de implantes PA 600 tras ensayo de cultivo con células MC3T3 durante 14 días. Imágenes A y C muestras control. Imágenes B y D muestras activadas.

En la figura 80 se aprecia dos muestras con células MC3T3 implantadas, la de la izquierda se trata del implante PA 400 (imágenes A y C) a 1000 y 2000, mientras que el de la derecha se trata del implante PA 600 (imágenes B y D) a 1200 y 2000 aumentos. En ambos implantes se objetiva correcta adhesión y proliferación celular sobre la superficie rugosa de los poros.

Estas imágenes permitieron validar no solamente la correcta adhesión de las células en el interior de los poros del implante sino también su proliferación.

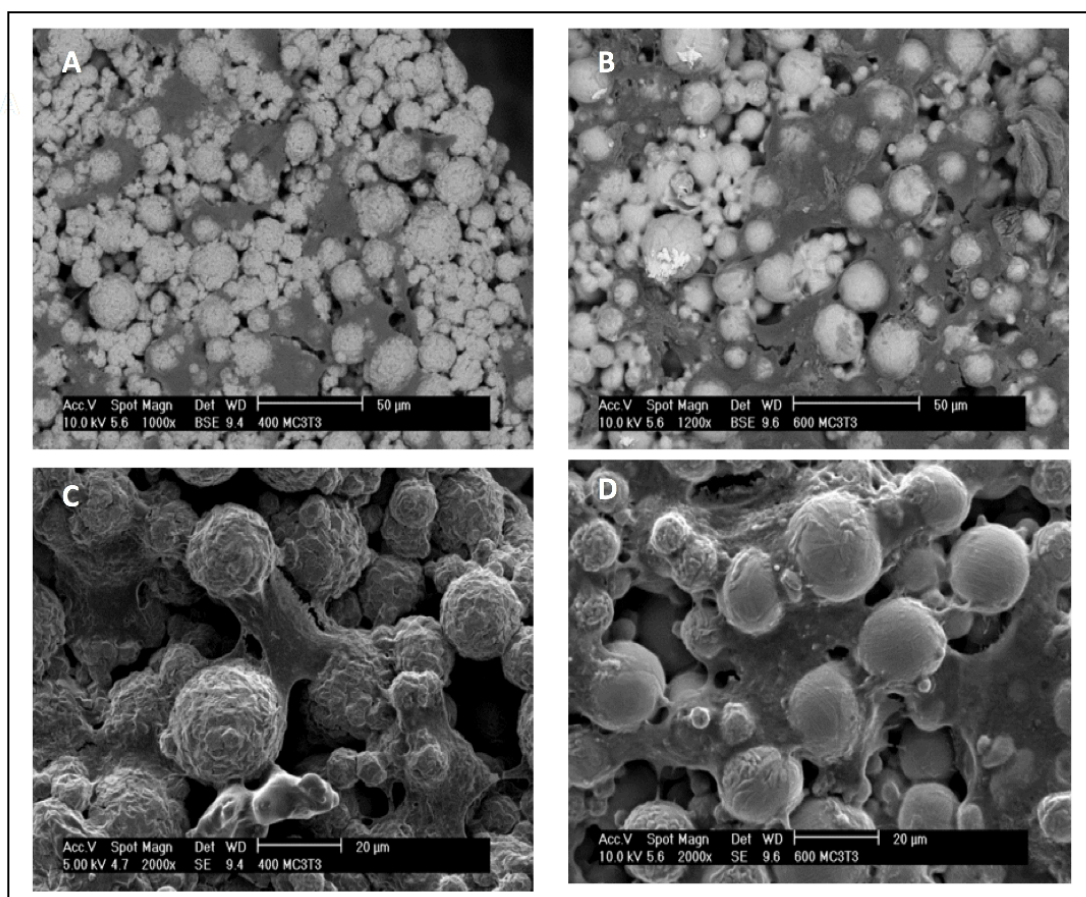


Figura 80: Imágenes de SEM tomadas en modo SE de implantes PA 400 activados (imágenes A y C) e implantes PA 600 activados (imágenes B y D) tras ensayo de cultivo con células MC3T3 durante 14 días.

2. RESULTADOS IN VIVO

En el estudio *in vitro* se observó que no existen diferencias significativas en la viabilidad celular a tiempos largos (7 días en C2C12 y 14 días en MC3T3) entre los tres tipos de implante. Sin embargo, sí se aprecian diferencias significativas a los cuatro días de incubación con las células MC3T3-E1. Este hecho demuestra que las superficies de titanio son totalmente biocompatibles con una línea celular específica de hueso, ya que se alcanzan valores de actividad metabólica similares entre las tres muestras y con el control, y que dicha actividad aumenta al aumentar el tiempo de ensayo.

El estudio mediante SEM demostró la adherencia de las células a todos los implantes y su crecimiento en el interior del mismo gracias a la microscopía electrónica.

Al no apreciar diferencias significativas tanto en la adhesión como la proliferación celular en los tres tipos de muestras, decidimos realizar un estudio planteando la hipótesis nula de que no existen diferencias entre los tres implantes en su implantación *in vivo*.

Para la creación del defecto se utilizó el modelo de defecto en calota desarrollado por Kramer, entendiendo que era el que mejor se adaptaba a los requerimientos de nuestro estudio. Todos los implantes colocados en la calota de los conejos se osteointegraron correctamente. El espesor medio del hueso parietal y frontal fue de 1,45mm y 2,15mm respectivamente.

El estudio consta de un total de nueve sujetos a los cuales se les ha implantado tres implantes distintos (PR 800, PA 600 y PA 400), es decir para el estudio dispongo de tres implantes experimentales. Además, se han tomado medidas repetidas para cada individuo, a las semanas seis y doce.

2.1. Evaluación formación ósea con nano SPECT-CT

Con el objeto de valorar la correcta osteointegración de los implantes, las muestras de la calota de conejo con los implantes se han fotografiado con el equipo nanoSPECT-CT de MEDISO (Figura 81). Se objetivó el correcto posicionamiento de los implantes en todos los conejos, sin signos de desplazamiento, ni fractura.

También se pudo objetivar en el CT no solo la continuidad del hueso cortical alrededor del implante, sino también la formación de hueso en el interior de este (Figura 82). Las imágenes del interior del implante fueron reconstruidas en varios planos, de igual manera la interfase entre el material y el nuevo hueso formado no se puede valorar tan bien como en la anatomía patológica debido al artefacto del implante, ya que, aunque este sea menor que en los implantes clásicos, sigue existiendo.

En general, la regeneración ósea comenzó desde el hueso adyacente al defecto y progresó hacia el área central del defecto. Los implantes porosos completaban prácticamente el defecto (definiendo como gap <0,5mm) en todos los casos.

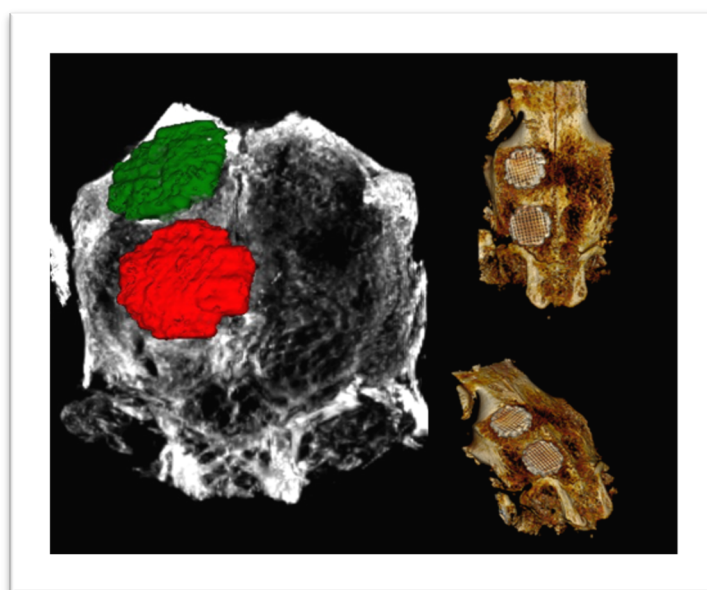


Figura 81: Reconstrucción tridimensional de la muestra de calota de conejo con la integración de los implantes.

Los volúmenes que se analizaron fueron:

- Volumen Total de Hueso (VTH): volumen total de hueso formado. El volumen se midió en mm^3 . Se generó una serie de ROIs (Region of Interest) que contenían el implante haciendo un computo del total de estos a través del programa visor DICOM Horos, calculando el volumen total del hueso de cada implante.
- Volumen de Hueso Externo (VHE): hueso formado alrededor. Se definió como el hueso neoformado alrededor del implante, el volumen se creó definiendo regiones de interés que ocupan el implante y el hueso neoformado alrededor del mismo (VTH2) y restando a este volumen el Volumen total de hueso (VTH).

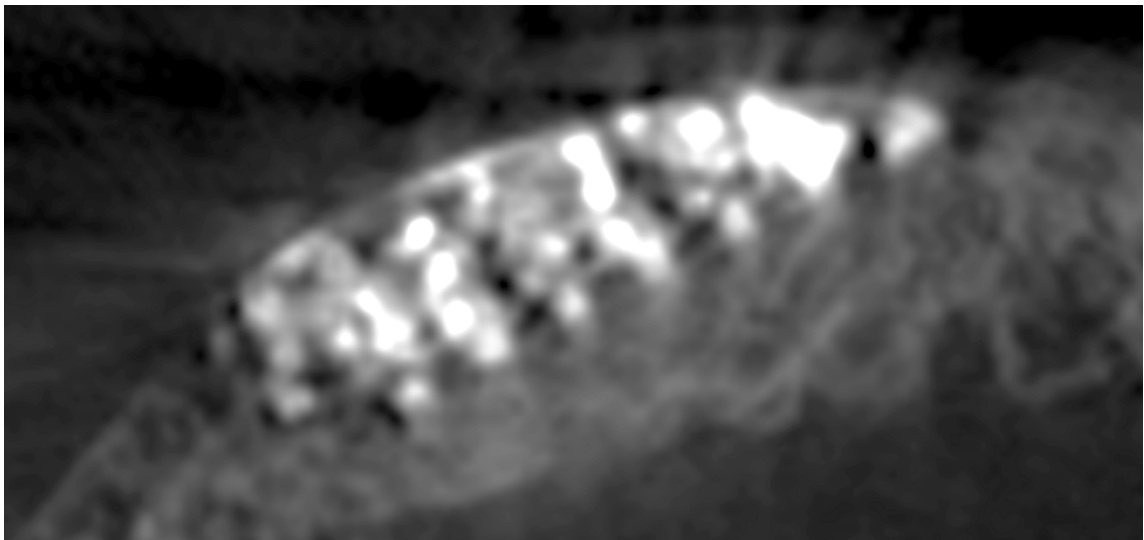


Figura 82: Corte coronal del dispositivo donde se aprecia el correcto posicionamiento y el crecimiento de hueso intraimplantario.

En la figura 83 se muestran los resultados para la variable VTH. Se midió el volumen óseo total para los distintos tipos de implante. Las mediciones se hicieron a las seis y a las doce semanas tras implantarse el dispositivo. Los resultados se expresaron en mm^3 .

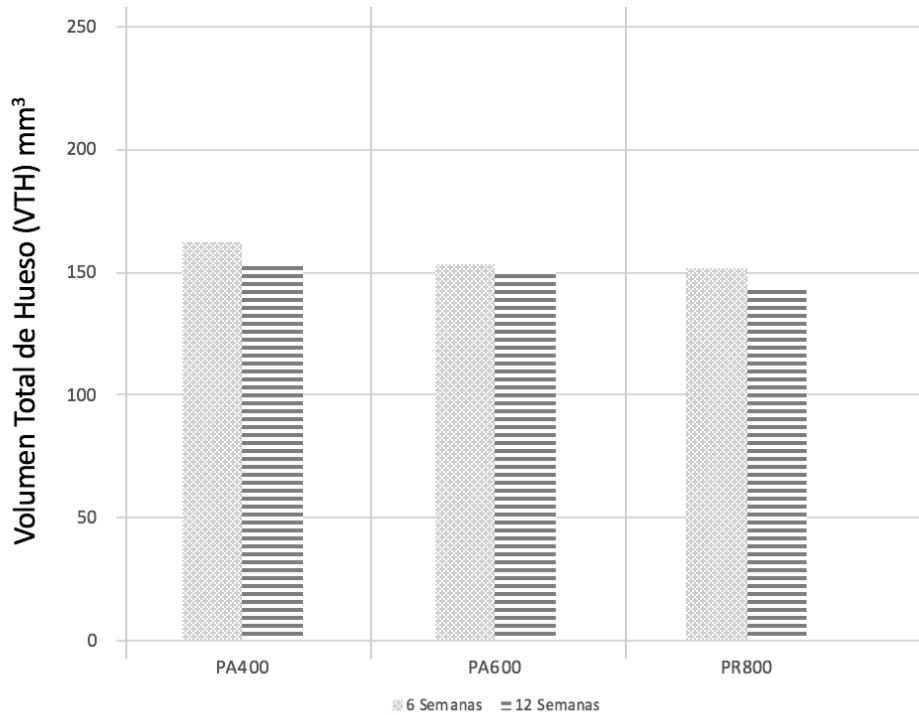


Figura 83: Resultados de la variable volumen óseo total.

Cuando la variable respuesta o dependiente es VTH, obtenemos estadísticos descriptivos para cada grupo definido por las variables tipo de implante y semanas. Obtenemos media, desviación típica y FSLD (Fisher Least Significant Difference) que indica el mínimo valor de diferencia entre las medias de dos grupos para que se consideren diferencias significativas, si rechazásemos la hipótesis nula del ANOVA.

Planteando el modelo mixto con un factor intersujetos o between (tres niveles respectivamente) y un factor intrasujetos o within (dos repeticiones de medidas). La interpretación de los resultados nos lleva a determinar que no hay diferencias en las medidas de VTH entre los tres implantes ya que el estadístico $F_{2,6} = 0.08686152$ tiene un p-valor 0.9179358. Tampoco existen diferencias significativas entre los dos niveles del factor tiempo ya que obtenemos un estadístico $F_{1,6} = 0.24389028$ y un p-valor 0.6389662. La interacción entre los factores punta y tiempo tampoco resulta significativa $F_{2,10} = 0.01952748$ y el p-valor 0.9807240.

Como conclusión podemos sugerir que los cambios en el tipo de implante no influyen en la respuesta VTH y tampoco hay evidencias que muestre cambios a lo largo del tiempo (seis y doce semanas), ni que exista interacción entre ambas variables. Sin

embargo, podemos destacar que los mejores resultados se obtuvieron con los implantes PA 400, con mayor volumen óseo que los otros dos implantes a las seis y a las doce semanas, pero como se ha dicho sin diferencias estadísticamente significativas.

Repetimos ahora los cálculos para la variable respuesta Volumen de hueso externo (VHE). Obtenemos estadísticos descriptivos para cada grupo definido por las variables implante y tiempo. En la figura 84 mostramos gráficamente los resultados de la variable volumen de hueso externo (VHE).

Planteando el modelo mixto con un factor intersujetos o between (tres niveles respectivamente) y un factor intrasujetos o within (dos repeticiones de medidas), el ANOVA da el siguiente resultado.

La interpretación de los resultados nos lleva a determinar que no hay diferencias en las medidas de VHE entre los tres implantes ya que el estadístico $F_{2,6} = 0.5236391$ tiene un p-valor 0.6171483. Tampoco existen diferencias significativas entre los dos niveles del factor tiempo ya que obtenemos un estadístico $F_{1,6} = 0.5716506$ y un p-valor 0.4782274. La interacción entre los factores implante y tiempo tampoco resulta significativa $F_{2,10} = 1.1309248$ y el p-valor 0.3830204.

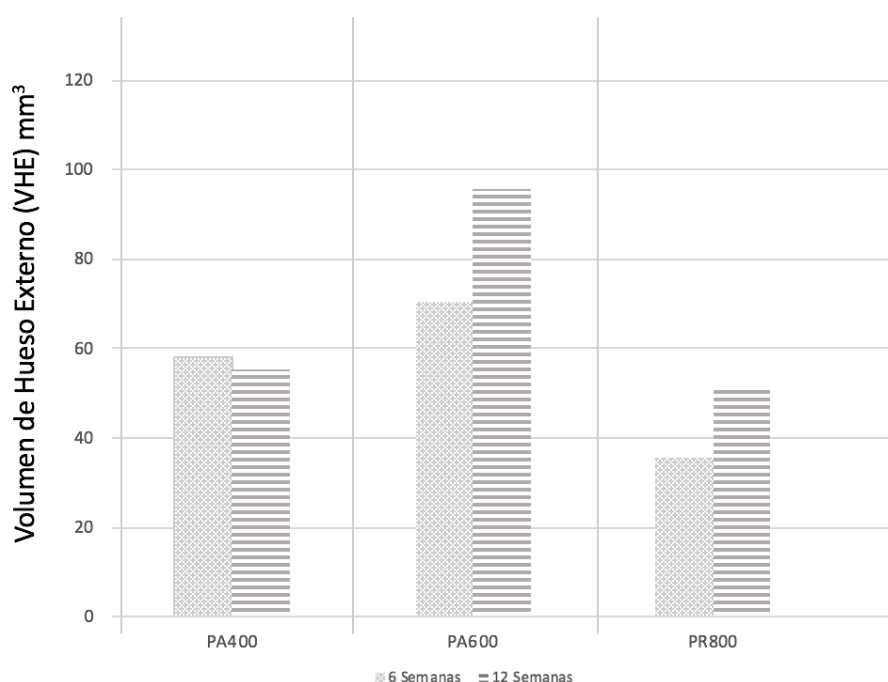


Figura 84: Resultados de la variable volumen de hueso externo para los tres tipos de implantes en función del tiempo.

Como conclusión podemos ver como el tipo de implante no influye en la respuesta VHE y tampoco hay evidencias que muestre cambios a lo largo del tiempo (a las seis y a las doce semanas), ni que exista interacción entre ambas variables. Aunque en este caso el implante que mejor respuesta ofreció fue PA 600, tanto a las seis como a las doce semanas, aunque sin diferencias estadísticamente significativas respecto a los otros dos implantes.

2.2. Evaluación formación ósea en Histología

Después del procesamiento histológico de las muestras en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), los bloques fueron estudiados todos por un único anatomopatólogo usando la técnica EXAKT (Figura 85), que estudió el porcentaje de ocupación de hueso del implante y el crecimiento perimplantario. En la figura 86 se muestran los resultados del porcentaje de integración de los implantes (entendiendo como el porcentaje de implante que fue ocupado en su interior por hueso nativo) a las seis y a las doce semanas.

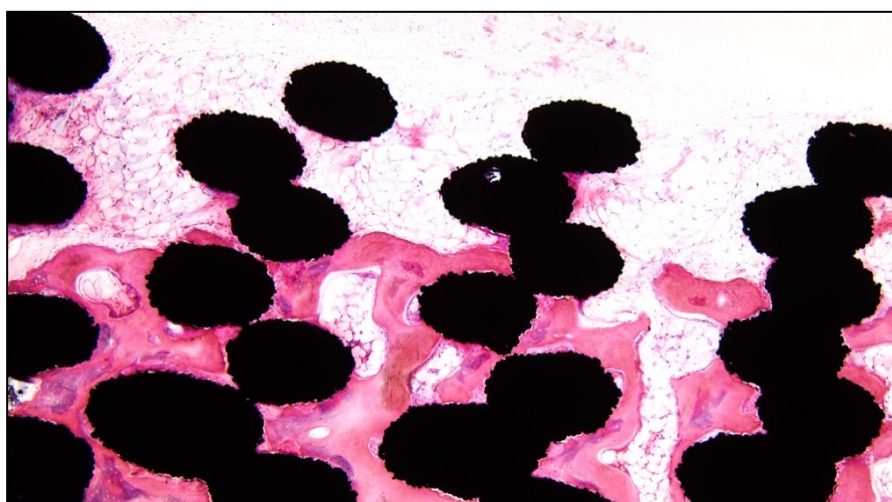


Figura 85: Imagen histológica de una muestra donde se objetiva crecimiento intraimplantario del hueso con integración de los filamentos de titanio.

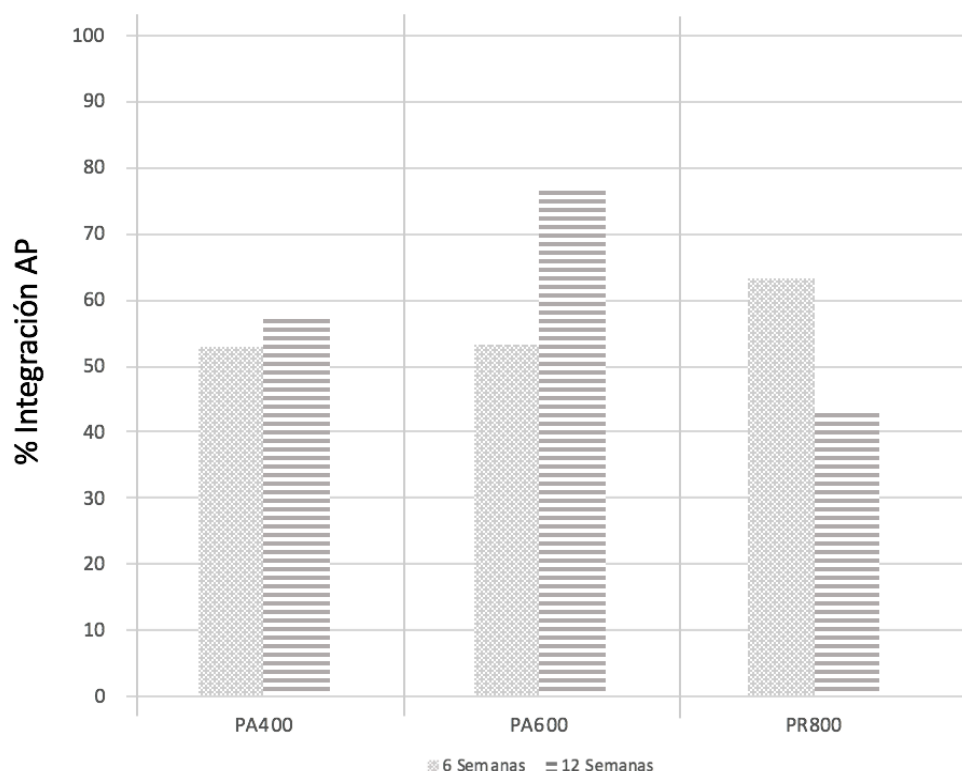


Figura 86: Resultados del porcentaje de integración anatomopatológica para distintos tipos de implantes en función del tiempo.

Finalmente repetimos ahora los cálculos para la variable respuesta integración AP. Obtenemos estadísticos descriptivos para cada grupo definido por las variables implante y tiempo.

Representamos gráficamente la evolución de la variable integración AP a lo largo del tiempo para los tres tipos de implantes en distintas líneas o trazos (Figura 87).

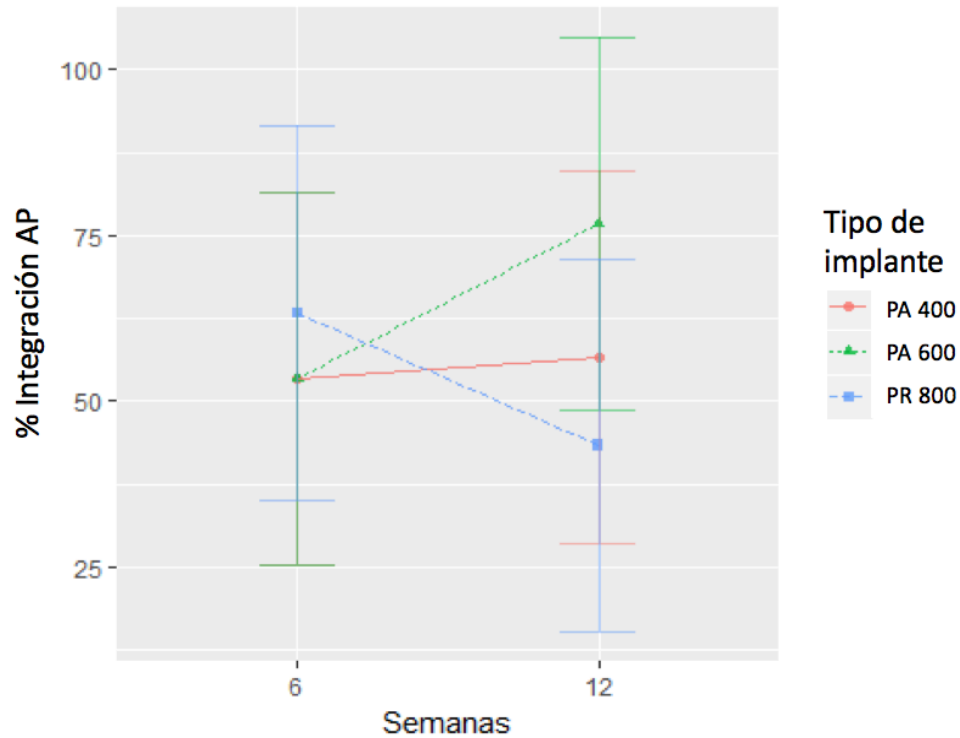


Figura 87: Evolución del porcentaje de integración ósea en el espacio de seis a doce semanas para los tres tipos de implantes diferentes.

Planteando el modelo mixto con un factor intersujetos o between (tres niveles respectivamente) y un factor intrasujetos o within (dos repeticiones de medidas), el ANOVA da el siguiente resultado.

La interpretación de los resultados nos lleva a determinar que no hay diferencias en las medidas de integración AP entre las tres puntas ya que el estadístico $F_{2,6} = 1.0000000000$ tiene un p-valor 0.4218750. Tampoco existen diferencias significativas entre los dos niveles del factor tiempo ya que obtenemos un estadístico $F_{1,6} = 0.02797203$ y un p-valor 0.8726691. La interacción entre los factores implante y tiempo tampoco resulta significativa $F_{2,10} = 0.88811189$ y el p-valor 0.4593540.

Como conclusión podemos sugerir que el tipo de implante no influye en la respuesta de integración AP y que tampoco hay evidencias que muestre cambios a lo largo del tiempo (a las seis y a las doce semanas), ni que exista interacción entre ambas variables.

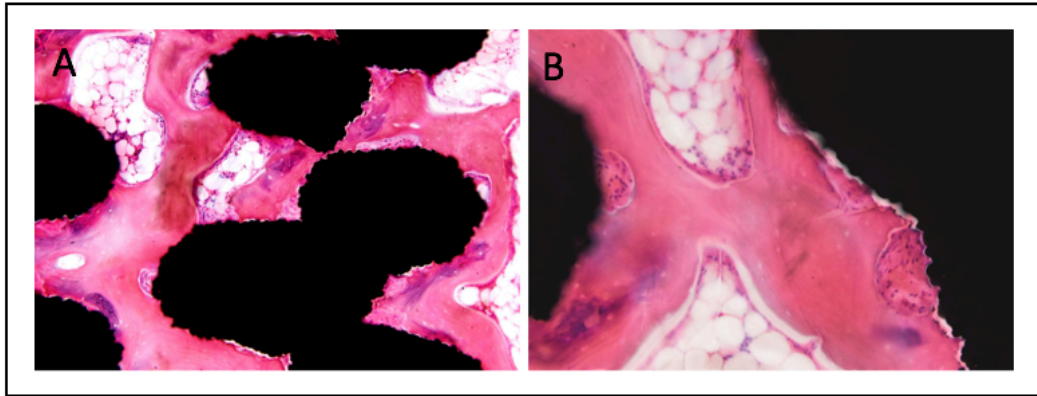


Figura 88: Neoformación de hueso en el interior de los implantes. A. Imagen a 200 aumentos. B. Imagen a 250 aumentos.

A mayores aumentos veremos matriz ósea de color rosado, y en su interior osteocitos. En la superficie de las trabéculas se aprecian en formación ribetes epiteloides de osteoblastos, los cuales se encargan de ir incrementando el tamaño del hueso en formación. El tejido circundante, muy bien vascularizado, está poblado por células indiferenciadas en las proximidades a la zona ósea en formación. (Figura 88).

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

La tecnología de manufactura aditiva permite crear, personalizar y/o reparar productos, redefiniendo la tecnología de producción actual. Es un medio para crear productos altamente personalizados con una disminución importante de costes frente a las técnicas de fabricación clásicas. En estas técnicas, la construcción de la estructura se realiza capa a capa mediante la deposición de aglutinantes sobre capas de polvo, deposición de suspensiones coloidales o mediante una sinterización local del polvo, dependiendo de la técnica empleada.

Dentro de las técnicas de manufactura aditiva, muchas de ellas han sido estudiadas para su utilización en biomedicina. La elección, en esta tesis, de la técnica de Robocasting como técnica de manufactura aditiva para el desarrollo de los implantes porosos de titanio se basa en el hecho de que se trata de una de las técnicas de manufactura aditiva más versátiles, ya que puede introducirse un gran número de variables tanto en la composición del material como en la estructura porosa final (Smay y cols., 2002), pero también por la escasez de su estudio en la literatura como técnicas de manufactura aditiva para biomateriales, siendo su aportación principalmente en el desarrollo y estudio de implantes de Hidroxiapatita o Fosfato Cálcico (Lan Levengood y cols., 2010; Miranda, Pajares, Saiz, Tomsia, & Guiberteau, 2008; Woodard y cols., 2007) y por su relativo bajo coste en comparación con otras técnicas.

El Robocasting se trata de la única de estas técnicas que permite el fabricado del implante utilizando una tinta (suspensión con alta concentración del material deseado para fabricar el implante, en nuestro caso polvo de Titanio) con un contenido orgánico mínimo capaz de soportar completamente su propio peso durante el ensamblaje. Esta versatilidad permite implementar las tecnologías de diseño de gránulos obtenidos por atomización y/o congelación, estructura core-shell, e incluso mezcla de partículas inorgánicas con espaciadores (Molero y cols., 2016), permitiendo diseñar estructuras customizadas, con complejos entramados tridimensionales.

Esta técnica permite la producción de estructuras con la porosidad óptima para obtener el comportamiento mecánico deseado y mantener las propiedades de

permeabilidad y difusión para su aplicación como implantes (Miranda y cols., 2008). Además, si el modelo CAD es obtenido de una prueba de imagen médica (TC o RMN), el implante puede ser diseñado a medida para encajar en el defecto del tejido dañado. Por otra parte, al tratarse de una técnica de prototipado rápido también es una técnica que asocia una disminución de costes logísticos y maquinaria permitiendo la rápida obtención del implante una vez diseñado, disminuyendo los tiempos de producción y los costes logísticos frente a otras técnicas. El principal problema asociado a esta técnica es la necesidad de una correcta obtención de la suspensión idónea para la fabricación del implante, por lo que es fundamental la persona encargada de realizar esta suspensión.

Los implantes se desarrollaron por parte del ICV junto con el grupo de tecnología de polvos de la UC3M (GTP-UC3M) según el protocolo descrito en el apartado de material y métodos. Los implantes utilizados en esta tesis compartían las características de tratarse de implantes uniformes, con una porosidad interconectada uniforme y distribuida homogéneamente. Todos los implantes presentaron porosidad abierta, estando los poros interconectados desde la superficie hasta el interior del implante, facilitando la osteointegración de este. Los metales porosos según Hrabe (Hrabe y cols., 2013) muestran efectos favorables para su uso en aplicaciones ortopédicas para disminuir el stress al que es sometido el hueso. Algunos artículos defienden que el tamaño del poro necesario para lograr la colonización de osteoblastos, crecimiento vascular y finalmente deposición de hueso dentro de los mismos debe ser de 200-500 micras (Van Der Stok y cols., 2013). Estudios como el de Cheng defienden que el espaciado de 200-400 micras aumenta la adhesión osteoblástica, la migración y proliferación celular por actuación de mecanorreceptores (Cheng y cols., 2014). En nuestro caso optamos por el estudio de tres espaciados distintos de 400 μm , 600 μm y 800 μm , con un diámetro de filamento de 410 μm en los dos primeros y 250 μm en el tercero, ya que fueron los que mejores resultados mecánicos presentaron en los estudios de compresión realizados.

Entre los diferentes ensayos realizados, se midió la resistencia a compresión mediante ensayos de compresión uniaxial con una resistencia a la compresión de aproximadamente 70 MPa, siendo estos valores similares a los revisados en la literatura (Imwinkelried, 2007; Ito y cols., 2014; Wieding, Souffrant, Mittelmeier, & Bader, 2013).

Uno de los principales efectos que buscábamos con esta técnica era disminuir el módulo elástico o módulo de Young para disminuir el efecto de “stress shielding”, intentado que el módulo elástico fuera lo más similar posible al de hueso. El módulo de Young del hueso cortical es de aproximadamente 15–20 GPa, la resistencia a la tensión se encuentra entre los 80-150 MPa, y la resistencia a la compresión entre los 90-280 MPa, debido principalmente al carácter anisotrópico del hueso. Estas propiedades corresponden al hueso cortical, en el caso del hueso esponjoso estas características disminuyen de manera significativa. En el hueso esponjoso el módulo de Young es de aprox. 0.010 y 2 GPa y presenta una resistencia a compresión lineal fuertemente correlacionada con la elasticidad, que está en el rango de 0.1 a 30 MPa.

El módulo de elasticidad de Young del titanio (100GPa) excede significativamente al del hueso cortical lo cual puede conllevar sobrecarga con reabsorción ósea periimplantaria. Es conocido que controlando la proporción y características del material (tamaño y morfología) el módulo elástico puede ser ajustado. Los implantes de titanio sinterizados con un 30% de porosidad presentan un módulo de Young cercano al del hueso cortical, aunque la presencia de esta porosidad conduce a la degradación de la resistencia mecánica del material debido a los defectos estructurales y a la concentración de esfuerzos alrededor de los poros. Es decir, con un tamaño mayor del poro, la resistencia del implante se ve significativamente disminuida, este es uno de los motivos por los que las cerámicas porosas solo pueden utilizarse clínicamente en el uso de pequeños defectos donde las cargas son compartidas y no en zonas que sufren cargas soportadas. Además, el titanio poroso es más susceptible a la corrosión que el titanio sólido debido a la gran superficie expuesta a los agentes corrosivos

Los valores del módulo elástico de nuestros implantes fueron respectivamente 2,48 (PA400), 2,13 (PA 600) y 2,29 GPa (PR 800), que son valores muy inferiores al módulo elástico del hueso cortical y cercanos a los del hueso esponjoso. En nuestro caso la porosidad fue del 66,16, 77,5 y 80,90 % respectivamente. Comparando con la literatura, Su-Hua Wu (Wu y cols., 2013) desarrolló mediante EBM un sustituto de disco vertebral, en el mismo valoró que el módulo de Young de la aleación Ti6Al4V era de 11GPa, que es aproximadamente 40 veces más alto que el del hueso esponjoso natural, pero mediante esta técnica disminuía a 2.5 GPa al adoptar una estructura porosa que le permitía acercarse a las características del hueso natural, mejorando la integración ósea

del metal. El grupo de Stübinger (Stübinger y cols., 2013) compararon el comportamiento de implantes clásicos frente a implantes dentales microporosos implantados en la pelvis de ovejas. No solo el comportamiento biológico fue similar, sino que los valores de torque fueron mayores para los implantes desarrollados con SLM, obteniendo menores tasas de reabsorción ósea perimplantaria.

El grupo de Ito en su estudio desarrolla unos implantes de titanio sinterizados con 80 y 90% de porosidad para acercarse a los valores del hueso esponjoso, obteniendo 0,5 y 0,3 GPa respectivamente (Ito y cols., 2014). Vemos como en la literatura a medida que aumenta la porosidad del implante disminuye su módulo de Young.

Aunque no solo la porosidad, sino también el tipo de aleación puede disminuir el efecto de “stress shielding”. Hoffman y Habijan (Habijan y cols., 2013; Hoffmann y cols., 2014) desarrollaron a través de SLM implantes porosos de Niquel-Titanio (NiTi). La aleación de NiTi presenta particularmente un bajo modulo de Young, similar al del hueso cortical, que junto a las técnicas aditivas permiten disminuir el módulo de Young a prácticamente el del hueso natural, consiguiendo una gran adhesión ósea al implante en su estudio. El grupo de Luthringer (Luthringer y cols., 2013) desarrolló materiales porosos de titanio (Ti-6Al-4V) mediante FDM, exhibiendo propiedades mecánicas cercanas a las del hueso cortical nativo, con un módulo elástico de 21 GPa y una porosidad del 31%.

Desde el grupo de investigación entendimos que para la validación de los diferentes materiales es preciso comenzar realizando un estudio *in vitro* en laboratorio. La respuesta biológica a un nuevo biomaterial se evalúa en primera instancia *in vitro*, a través del análisis de la adhesión celular, la proliferación y la viabilidad. Si estos efectos no se pueden demostrar de manera clara y sin lugar a duda a nivel de las moléculas o en preparados de células aisladas, no hay razón para continuar la investigación científica de estos efectos a otros niveles de complejidad en los organismos vivos. En nuestro caso quisimos plantear un estudio *in vitro* para validar la biocompatibilidad del implante y el crecimiento celular en el mismo. El estudio fue desarrollado por los investigadores del grupo Noricum S.L. adscrito a la Universidad Complutense de Madrid.

Como línea celular modelo para el desarrollo experimental en nuestro estudio *in vitro* se ha empleado la línea premioblástica de ratón C2C12, y la línea adherente

preosteoblásticas de ratón MC3T3. Esta se obtiene de calota de ratón, teniendo la capacidad de diferenciarse en osteoblastos y osteocitos, formando tejido óseo calcificado in vitro (Becker y cols., 2006; Wiemann y cols., 2002).

La BMP-2 o proteína morfogenética ósea es un miembro de la familia de proteínas TGF-beta. Esta al igual que otras proteínas morfogenéticas óseas, juega un papel importante en el desarrollo del hueso. La BMP-2 ha sido ampliamente utilizada para acelerar los procesos de reparación ósea, así como para tratamiento médico y en implantes dentales (Becker y cols., 2006).

Uno de los objetivos de esta tesis era estudiar el efecto de la adición de la proteína a los implantes desarrollados, ya que era de esperar que la adición de la proteína a los implantes y su liberación continuada estimulará la formación de hueso en la superficie del implante y promoviera una aceleración de la regeneración ósea a nivel del hueso dañado. Es por ello que muchos estudios han incorporado la proteína en implantes para estimular y aumentar la formación de hueso más rápidamente (H.D. Jung y cols., 2012).

También han sido descritos efectos adversos como la formación de hueso heterotópico o la activación de osteoclastos con la consecuente resorción ósea. Estos efectos negativos se han visto cuando se han añadido dosis suprafisiológicas en cortos espacios de tiempo (Brie y cols., 2014). El desarrollo de un sistema de liberación controlada durante un periodo controlado de tiempo ha sido uno de los principales objetivos de muchos investigadores, varios materiales han sido propuestos como polímeros sintéticos, polímeros naturales y fosfato cálcico.

Múltiples biomateriales basados en el quitosano han sido utilizados como sistemas de liberación controlada (Lee, y cols., 2002). En nuestro caso, basándonos en los estudios del grupo de Civantos (Abarrategi y cols., 2008) se optó por la utilización del quitosano como material de liberación. El quitosano se trata de un biopolímero de aminopolisacáridos, compuesto por unidades distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada).

Su descubrimiento data de 1859 y sus usos son múltiples en el sector agrario e industrial. El quitosano permite no solo la liberación de los factores de crecimiento, sino

también su encapsulación para evitar su degradación y deterioro. Los hidrogeles derivados de este polímero se emplean con frecuencia como sistemas de liberación controlada ya que, sumado a sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad, presenta una gran capacidad de reabsorción de agua (Bhattacharai y cols., 2010).

De acuerdo con Carré y Lacarriére (Carré y cols., 2010), el proceso de adhesión celular consta de cuatro fases: primero la absorción proteica, en segundo lugar, el contacto celular, tercero la adhesión celular y finalmente la interacción célula-célula. Estos pasos están influenciados por varios factores como la rugosidad de la superficie, la porosidad, la topografía, polaridad, carga o la composición química.

En la actualidad se disponen de numerosas técnicas para determinar la proliferación celular, basándose la gran mayoría de ellas en una medida indirecta de la misma, determinando parámetros relacionados con la cantidad de células totales. Un ejemplo es la cuantificación de las proteínas totales presentes en el cultivo o la determinación de actividades metabólicas específicas. A pesar de ser, como hemos dicho, técnicas indirectas, son de uso frecuente en investigación ya que se tratan de métodos rápidos, sencillos y reproducibles.

Para nuestro estudio como método de ensayo inicial para la evaluación de la proliferación celular se empleó el ensayo de Alamarblue. Este tipo de estudio es utilizado a nivel mundial tanto en industria como en laboratorios para poder determinar la actividad metabólica de las células en los distintos tipos de cultivos. Su análisis es sencillo, preciso y no es tóxico.

El principal compuesto del Alamarblue es Resazurina, un colorante no fluorescente, de color azul y soluble en el agua, el cual entra en las células del cultivo y en presencia de células metabólicamente activas es reducido a Resorufina (compuesto fluorescente de color rosa). La señal de fluorescencia obtenida por la reducción de resazurina es directamente proporcional a la cantidad de células presentes.

Permite controlar el crecimiento celular (proliferación) pero también valorar la citotoxicidad (muerte celular). Al no ser tóxico puede ser utilizado para cultivos a corto y largo plazo. (Nociari y cols., 1998; O'Brien y cols., 2000). En nuestro estudio a tiempos

cortos (24h) se aprecia un ligero incremento de la actividad metabólica de las células C2C12 en las muestras activadas con proteína BMP2, este hecho se debe a que dicha proteína sirve de punto de anclaje celular, facilitando así la adherencia de las células al soporte.

Como era de esperar, se observó un incremento en el metabolismo en todas las muestras con un crecimiento exponencial de las células, aunque las diferencias entre las muestras de control (las que no presentaban BMP-2) y las muestras activadas (con 10 microgramos de BMP-2) no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). A medida que pasa el tiempo, esta proliferación celular (en el caso de las muestras con proteína) disminuye en comparación a aquellas muestras que no presentan BMP-2, debido a que dicho factor activa la diferenciación en lugar de la proliferación celular, se entiende que por este motivo se obtiene una actividad metabólica ligeramente superior en las muestras sin recubrimiento activo.

El crecimiento celular fue continuo, aunque tuvo su auge a partir del cuarto día de medición, esto se podría justificar por la pérdida inicial de células en la siembra hasta que las remanentes se adhirieron a los filamentos para posteriormente comenzar su crecimiento.

Gracias a la presencia del grupo fluorescente GFP en las células C2C12, se pudo seguir el proceso de adhesión y proliferación celular durante el tiempo del ensayo, en las microfotografías de microscopía fluorescente invertida de diferentes especímenes a estudio.

La muestra que mejor comportamiento mostró a los siete días fue el implante PR 800 en aquellas muestras no activadas con BMP-2 aunque en la fase inicial del estudio (a los cuatro días) fue el implante PA 600 el que tuvo una mejor actividad registrada. Torres-Sánchez (Torres-Sánchez y cols., 2017) y su grupo concluían que, a menor tamaño del poro, mayor era el área de superficie siendo esto favorable para adhesión celular en los primeros días de cultivo, si bien cuando la proliferación celular aumentaba, las muestras con mayor tamaño de poro presentaban los mayores datos de crecimiento.

En las muestras activadas con BMP-2 el implante PA 600 fue el que presentó una mejor actividad a los siete días, siendo muy similar a los cuatro días con el implante PR 800, a pesar de ello las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

No existieron diferencias con y sin proteínas en Alamarblue, ni en el seguimiento por fluorescencia. Estos datos difieren de los obtenidos en la literatura revisada, por lo que se evidenció, como comentamos previamente, que el recubrimiento de quitosano con BMP2 no fue efectivo, ya que cuando se activaron las proteínas, el quitosano no se adhirió a la superficie, y en contacto con el medio se despegó el film, perdiéndose la proteína que iba en el.

En el caso de las células MC3T3 su actividad metabólica no se determinó a las 24 horas porque son células con una velocidad de crecimiento menor que las C2C12 y son más sensibles al ensayo de Alamarblue, pudiendo interferir dicho experimento en su proceso de adhesión y proliferación sobre los implantes. De Ahí que solo disponemos de las medidas a 4, 7 y 14 días. Se pudo observar como a los cuatro días el implante PR 800 dio valores ligeramente superiores a las otras dos muestras, mientras que a los catorce días las tres muestras alcanzan valores muy similares.

Al igual que para C2C12, se observó un incremento en el metabolismo en todas las muestras. En este caso el pico de crecimiento se produjo entre los 7 y 14 días, teniendo un crecimiento exponencial en todas las muestras, esto posiblemente sea debido a que como se ha comentado previamente la velocidad de crecimiento de las células MC3T3 es menor que el de las células C2C12.

La muestra que mejor comportamiento presentó en el ensayo de Alamarblue fue PR 800 activada con BMP-2 tanto a los 7 como a los 14 días, aunque las diferencias entre las tres muestras no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En nuestro caso la muestra PA 600 al tener menor espaciado y un mayor diámetro de filamento pudo presentar mejor adhesión inicial al tener mayor superficie, aunque a largo plazo la muestra con mayor tamaño de poro (PR800) fue la que presentó mayor proliferación celular.

En las muestras no activadas los implantes con mayor actividad metabólica fueron PA 600 y PR 800, cuyos valores fueron muy similares tanto a los 7 como a los 14 días. Las diferencias entre las muestras de control y las activadas no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Respecto a la determinación del contenido total de proteínas y la actividad ALP, nos interesaba conocer si se había producido diferenciación celular, para ello la fosfatasa alcalina es un indicador de diferenciación ósea en los estadios de diferenciación preosteoblástica y osteoblástica, mientras que la determinación del contenido total de proteínas se utiliza para cuantificar la proliferación celular.

Como método de ensayo inicial para la evaluación de las proteínas totales se empleó el método de Bradford (Bradford, 1976). Esta técnica cuantifica la cantidad de proteínas totales, basándose para ello en la afinidad del colorante azul de Coomassie G250 por aminoácidos básicos y aromáticos presentes en las proteínas (especialmente Arginina, Triptófano, Fenilalanina y Prolina).

El ensayo de Bradford es una técnica de uso frecuente en trabajos que emplean proteínas morfogenéticas óseas (López-Lacomba y cols., 2006) para poder cuantificar la actividad de las mismas sobre cultivos celulares. En nuestro estudio, los valores de proteínas totales fueron similares en ambas superficies, observando una disminución de la concentración en aquellas activadas con BMP-2. De igual manera, no existieron diferencias estadísticamente significativas a los 4 días.

Los valores de proteínas totales en el cultivo de C2C12 fueron similares en todas las muestras. La mayor concentración de proteínas se objetivó en las muestras PR 800 no activadas con BMP-2. Llama la atención como se observó una disminución del contenido total de proteínas en aquellas muestras activadas con BMP-2 en los implantes PA 400 y PR 800 frente a las muestras no activadas. En los implantes PA 600 aquellas muestras activadas con BMP2 si presentaron una mayor concentración de proteínas frente a las no activadas. De igual manera, no existieron diferencias estadísticamente significativas a los 4 días en ninguna de las muestras.

En el caso del cultivo de células C2C12, para la detección de la actividad de fosfatasa alcalina el mayor valor fue registrado por la muestra PA400 no activada. Se objetivó valores mayores en las muestras PA 400 y PA 600 no activadas con BMP-2 frente a las activadas. En el caso de los implantes PR 800, el valor de ALP fue mayor en las muestras activadas con BMP-2 frente a las no activadas. Al igual que en la cantidad total de proteínas, no existieron diferencias estadísticamente significativas a los 4 días en ninguna de las muestras.

Lo que se está midiendo claramente es la cantidad de ALP producida, pero para que esa ALP presente diferencias, se ha tenido que unir previamente la rhBMP-2 a los receptores correspondientes existentes en las células C2C12 y desencadenar la cascada de señales que provocan la diferenciación de estas células hacia el linaje osteoblástico. Por lo tanto, lo importante es la cantidad de rhBMP-2 presente realmente en contacto próximo con las células sembradas.

En el caso del cultivo de células MC3T3, la medición de proteínas totales fue también bastante similar en todas las superficies, mostrándose ligeramente superior en las muestras no activadas del implante PA 600.

Respecto a la detección de la fosfatasa alcalina en la línea MC3T3, la muestra con mayor nivel de fosfatasa alcalina fue PA 400 no activada con BMP-2. Las muestras no activadas con BMP-2 obtuvieron valores más altos de fosfatasa alcalina en todas las muestras, aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de implante ni la presencia o no de BMP-2.

En los datos presentados por Aubin (Aubin y cols., 2001), las células MC3T3-E1 maduran a osteoblastos a los 14 días y comienzan a madurar a osteocitos a los 21-28 días. La diferenciación a osteoblastos sigue tres etapas: proliferación, síntesis de la matriz y maduración, y finalmente la mineralización (Pullisaar y cols., 2014; Stein & Lian, 1993). Como los preosteoblastos se diferencian en osteoblastos y estos en osteocitos, se esperaría un descenso en los niveles de ALP a medida que pasan los días de cultivo (Sargeant y cols., 2008).

Como ya se ha mencionado en los resultados, estos datos de ALP, junto al no presentar diferencias en las muestras activadas con BMP-2 sugiere que el recubrimiento de quitosano con BMP2 no fue efectivo, cuando se activaron las proteínas el film no se adhirió a la superficie del implante, y en contacto con medio se despegó ese film, perdiéndose la proteína que iba en él. Si comparamos con otros estudios, el grupo de Brie (Brie y cols., 2014) realiza un cultivo *in vitro* de osteoblastos humanos sobre implantes porosos desarrollados por SLM de Ti6Al7Nb, añadiendo Fosfato Cálcico en su interior y BMP, y se aprecia como los valores de ALP van disminuyendo a medida que avanza el estudio, lo cual es un signo indirecto de diferenciación celular.

En nuestro caso al no adherirse correctamente la BMP2 no hubo diferencias entre las muestras con BMP activadas y las muestras no activadas, pues no había proteína adherida (U.Müller, T. Imwinkelried, M. Horst, 2006). Estos datos se corroboran con otros estudios donde en condiciones similares si existen distintos niveles de ALP (Cheng y cols., 2017; Caparrós y cols., 2014).

Respecto a la tinción del citoesqueleto, esta se realiza a través de inmunocitoquímica directa. Esto permite observar a microscopía de fluorescencia el citoesqueleto y los núcleos celulares. En nuestro caso las imágenes mostraron correcta adhesión de las células al implante, tanto en su superficie como en el interior de los poros, mostrando crecimiento en toda la muestra. No se objetivaron diferencias para la adhesión y crecimiento de las células en función de la porosidad del implante.

El análisis con microscopio SEM de los implantes reveló diferencias en las estructuras de los tres implantes. Se objetivó una superficie rugosa, con adherencia celular a las muestras y cambios en la morfología celular con desarrollo de extensiones dendríticas y su adhesión a distintos puntos de la estructura. Este comportamiento coincide con el de otros trabajos similares (Brie y cols., 2014).

Estas imágenes no solo demuestran una correcta adhesión de las células en el interior de la estructura porosa de los implantes, sino también su crecimiento a ese nivel, lo cual confirma la posibilidad de crecimiento óseo en el interior del implante.

Como conclusiones del estudio in vitro evidenciamos que los tres tipos de muestras (PA 400, PA 600 y PR 800) son citocompatibles ya que todas ellas presentaron aumento de la actividad celular y no tuvieron signos de citotoxicidad en las mediciones repetidas a lo largo del tiempo que se hicieron.

En el estudio con microscopía se pudo apreciar por fluorescencia la distribución homogénea de las células C2C12, apreciando la correcta adhesión y proliferación celular a los 14 días en la superficie de los tres tipos de implantes, en presencia o ausencia de BMP-2.

Prácticamente no existen diferencias entre las muestras, pero se observa que los soportes PA600 y PR800 ligeramente mejoran o facilitan la adherencia y proliferación celular tanto de las C2C12GFP como de los osteoblastos MC3T3E1 con y sin proteína

BMP2. En ambas líneas celulares, se observa como rasgo común los menores valores en los implantes PA400. Tal vez el tamaño de espaciado mayor podría ser más apropiado para los ensayos *in vitro*, como son las muestras PR 800. Esto difiere con los estudios de otros autores donde defiende que el diámetro del poro idóneo para el crecimiento del hueso es entre 50-500 μm (Lambert, Ankem, Wyatt, Ferlin, & Fisher, 2013; Sargeant y cols., 2008), aunque en nuestro caso, la porosidad de nuestro implante no viene definido solo por el espaciado entre los filamentos, sino también por la microestructura de los mismos pudiendo aportar la porosidad necesaria para la adhesión y proliferación celular sobre los mismo. Aunque como se ha comentado previamente el tamaño ideal del poro varía mucho en la literatura.

No obstante, a tiempos cortos (cuatro días), se observa un incremento en la actividad metabólica de las células que proliferan sobre la muestra PR-800, destacando como la muestra que favorece los procesos celulares. Aunque no se aprecia este hecho con las C2C12-GFP mediante la microscopia de fluorescencia, hay que remarcar que es una línea celular diferente que presenta un comportamiento *in vitro* distinto.

Por otro lado, se evidenció que el recubrimiento de quitosano con BMP2 no fue efectivo en los cultivos de células C2C12, ya que cuando se activaron las proteínas éstas no se adhirieron a la superficie, y en contacto con el medio se despegaron del film de quitosano, perdiéndose la proteína que iba en el. Esto justifica el que no existan apenas diferencias entre las muestras activadas con BMP2 y las que no lo estaban. Esto puede justificar la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en el contenido total de proteínas y en los niveles de fosfatasa alcalina detectados.

Por último, el estudio de las muestras con Microscopía electrónica reveló una correcta adhesión de ambos tipos celulares, no solo en la superficie del implante, sino también en el interior de los poros, lo cual demuestra que es una superficie favorable para la adhesión celular permitiendo el crecimiento óseo y vascular en su interior. También se objetivó la correcta proliferación celular al evidenciar puentes celulares entre los gránulos de la superficie del implante.

Al presentar las tres muestras correcta adhesión y proliferación celular, y no hallarse diferencias estadísticamente significativas entre ellas, decidimos que para el siguiente paso en la validación de los implantes incluiríamos las tres muestras.

Tras una búsqueda bibliográfica exhaustiva, consideramos que, al haber demostrado la biocompatibilidad y ausencia de citotoxicidad de nuestros implantes, debíamos dar un paso más y plantearnos un estudio en modelo animal. Para ello precisábamos de un modelo que simulará las condiciones en las que queremos utilizar nuestros dispositivos, que creara un defecto óseo, el cual pueda ser regenerado a través de la utilización del implante.

En la literatura existen varios modelos de defectos óseos en animal para el estudio in vivo de implantes porosos. La mayoría de los estudios de implantes porosos han buscado valorar los resultados del implante en animales en condiciones de cargas soportadas. Por ejemplo, Jia y su grupo (Lv y cols., 2015) en su estudio utilizaron implantes porosos de titanio desarrollados con EBM para cubrir defectos de cóndilo femoral medial en conejos, mientras que Yang (Yang, 2015) y Su-Hua Wu (Wu y cols., 2013) desarrollaron a través de EBM un cuerpo vertebral artificial, observando buenos resultados en ovejas, sustituyendo la vértebra por el cuerpo artificial.

En nuestro caso buscábamos un modelo que afectará al área craneofacial, por lo que nos mostramos partidarios del modelo de defecto óseo en calota, ya que este modelo tiene muchas similitudes con la región maxilofacial. Tanto morfológicamente como embriológicamente, la calota se desarrolla de una membrana precursora, de la cual se obtienen los huesos membranosos de la cara. Anatómicamente, la calota consiste en dos porciones corticales con una región central de hueso esponjoso, similar a la distribución ósea de la mandíbula. Un ejemplo de este modelo es el estudio de De Wild (De Wild y cols., 2013), donde estudió el comportamiento de las propiedades mecánicas y osteoconductoras de unos implantes porosos de titanio desarrollados a través de SLM utilizados como sustituto óseo en defectos de calota en conejos en comparación con defectos no tratados.

El modelo en calota es muy popular debido a múltiples motivos:

- La estructura ósea de la calota permite establecer un defecto uniforme, reproducible y estandarizado, el cual es fácilmente evaluable por análisis radiológico e histopatológico.

- La localización anatómica permite un fácil acceso quirúrgico y manejo intraoperatorio.
- El pericráneo y la piel suprayacente suponen un adecuado soporte para el material que vaya a ser insertado, sin la necesidad de fijación interna o externa de ningún tipo.
- El modelo ha sido ampliamente estudiado y usado con diferentes tipos de materiales para injerto.

Una de las limitaciones del modelo animal elegido con la colocación del implante a nivel de calota es que se trata de un modelo donde el implante no sufre cargas, y por lo tanto es inadecuado para determinar los resultados a largo plazo de un implante que vaya a ser sometido a cargas soportadas. En nuestro caso a pesar de no ser un modelo valido para determinar los resultados a largo plazo, si que es un modelo que provee información valiosa acerca de la respuesta inicial del huésped a los implantes porosos. Por otro lado, los valores en los test mecánicos que se realizaron a los implantes demostraron valores similares a otros implantes evaluados en estudios, que demostraron un buen comportamiento en estudios *in vivo* donde eran sometidos a cargas soportadas (Yang y cols., 2015; Wu y cols.,2013).

Decidimos utilizar este modelo al plantear que el tamaño de nuestro implante (10 mm de diámetro por 4 mm de altura) se ajustaba mejor al tamaño de la calota de conejo. La fácil disposición de los animales, así como la infraestructura que disponíamos era la óptima frente a la rata, cuya calota era demasiado pequeña para la implantación de nuestro dispositivo. Otra de las principales ventajas de este modelo, es que nos permite realizar un defecto descrito por Kramer (Kramer y cols., 1968), sin necesidad de entrar en contacto con la duramadre, lo cual puede conllevar un incremento importante en la morbilidad y tasa de complicaciones. Esta fue otra de las razones por las que se seleccionó este modelo.

Para el estudio *in vivo* decidimos prescindir de la adición de proteínas BMP2, ya que aunque era uno de los objetivos planteados inicialmente por el doctorando en la tesis, pretendiendo estudiar la posibilidad de valorar crecimiento óseo intraimplantaria cuando

el dispositivo fuera implantado en una localización donde no existan células progenitoras óseas (p.ej. músculo), los resultados del estudio *in vitro* habían presentado despegamiento del film de quitosano, que era el sistema de liberación controlada del que disponíamos, por lo que consideramos que este despegamiento también podría producirse en un nuevo estudio.

Por otro lado, la adición de BMP-2 en implantes microporosos ya ha sido estudiada en la literatura, por ejemplo Jia (Lv y cols., 2015) en su estudio para cubrir los defectos de cóndilo femoral medial en conejos, utilizó implantes de titanio (Ti₆Al₄V) desarrollados por EBM, los cuales fueron impregnados con factores de crecimiento (rh-BMP2 y rh-VEGF165). En este estudio la adición de las proteínas se realizó con una solución de fibrinógeno y trombina, obteniendo buenos resultados con la adicción de ambos factores de crecimiento, aunque curiosamente no con la sinergia de ambos. También el grupo de Carmen Brie estudió la adición de sustancias osteoinductivas como la HA o BMPs a los implantes de Ti₆Al₇Nb desarrollados por SLM para mejorar la osteointegración (Brie y cols., 2014), aunque solo la HA asoció un mayor índice de mineralización, sin que ninguna de las dos sustancias aumentará la adhesión celular, al igual que en nuestro estudio *in vitro*.

En consecuencia, los estudios que se realizaron en este proyecto se basaron en modelos validados y la experiencia de la bibliografía previa, evitando así el tener que realizar determinaciones innecesarias de parámetros ya caracterizados en estos modelos animales y, por tanto, disminuyendo el sufrimiento de estos. Al plantear el número de animales necesario para el ensayo ya se tuvo en cuenta el mínimo tamaño de muestra para evitar la repetición de procedimientos en un mismo animal. Tras la revisión de la literatura y la consulta con estadísticos, se decidió disponer para el estudio de nueve especímenes de conejo neozelandés.

El alojamiento, los cuidados, así como los procedimientos seleccionados en la experimentación se refinaron para tratar de eliminar o reducir al mínimo posible el dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero en los animales. En cualquier caso, consideramos que las buenas prácticas de ensayo en animales estaban garantizadas por el historial del equipo, ya que todos los miembros del equipo están habilitados en las

categorías A, B, C y D del RD 1201/2005, del 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

En todos los casos en el momento de la extracción y/o recuperación de las muestras se realizó un estudio descriptivo sobre el estado de la herida, así como del tejido adyacente. En general no se encontraron signos de inflamación anormales (diferentes de los del proceso de cicatrización normal en este tipo de heridas) ni de rechazo, ni hubo síntomas de infección, presencia de pus o tejido necrosado con los diferentes implantes y tiempos empleados en los distintos estudios.

Todos los implantes colocados en la calota de los conejos se osteointegraron correctamente siguiendo los parámetros descritos por Misch (Misch y cols., 1999), sin signos de rechazo:

- Ausencia de dolor: al aplicar fuerzas de torque y a la percusión.
- Ausencia de movilidad de los mismos.
- Ausencia de periimplantitis.
- Ausencia de aumento de profundidad del sondaje.

Cómo ya se comentó en la sección de material y métodos, se realizó un estudio de la calota de los conejos con los dispositivos implantados con técnica de SPECT-CT para valorar la correcta osteointegración de los implantes en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA).

Consideramos una limitación del estudio el no poder disponer de imágenes SPECT-CT previas a las seis semanas. Esto fue debido a la dificultad logística de poder trasladar a los animales a un centro que dispusiera de este tipo de pruebas de imagen. Es por ello por lo que se optó por analizar las muestras una vez sacrificados los animales, para poder disponer de dos muestras implantadas en distintos tiempos, considerando a las seis y a las doce semanas los tiempos más habituales en la literatura revisada.

El estudio por SPECT-CT mostró correcta integración de todos los implantes a nivel de calota de conejo, sin desplazamiento de los dispositivos respecto a su posicionamiento inicial, ni signos de fractura. El crecimiento óseo comenzó desde el

hueso adyacente al defecto y progresó hacia el área central del defecto. En general, la mayoría de los implantes completaron el gap lateral que existía con el defecto óseo (definido según Van der Stock y cols., como menor a 0.5mm).

Los datos de espesor del hueso parietal y frontal, así como la curvatura en el SPECT-CT concuerdan con los de Guo (Guo y cols., 2013) donde ya sugería que el cráneo de los conejos es un buen candidato para la aplicación de estructuras tridimensionales de Titanio.

La comparación en la distribución del hueso nuevo formado observado en el CT y la de la muestra histológica indica la disminución de artefactos asociados respecto a los implantes macizos clásicos. Ya Ito (Ito y cols., 2014) describía la menor asociación de artefactos radiológicos de los implantes porosos de titanio frente a los implantes compactos clásicos. Aunque si bien esto es cierto, uno de los problemas con los que nos encontramos fue que este artefacto que, aunque ciertamente es menor que el de los implantes clásicos, dificultó la correcta valoración del crecimiento óseo, sobre todo en el interior de los poros del implante. De Wild y su grupo (De Wild y cols., 2013) también presentaron este problema en su modelo de calota de conejo, no pudiendo demostrar diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento óseo en ninguna de las muestras secundario al artefacto.

Se crearon regiones de interés para el estudio de cada implante. Con estas regiones de interés se pudo estudiar distintos volúmenes para comprobar el correcto crecimiento de hueso en el interior del implante, así como la adhesión al hueso remanente.

La primera variable a estudio fue el volumen total de hueso (VTH). En esta misma no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en el tipo implante ni tampoco en las dos mediciones en distintos tiempos (a las seis y a las doce semanas). Ya otros estudios como el de Lesaichot informaba de un máximo de crecimiento óseo de los días 28 al 56, aplanándose progresivamente la curva de crecimiento tras este día (Lesaihot y cols., 2011). Van der Stock y cols. refieren también un aplanamiento del crecimiento óseo a partir de la octava semana de implantación. Estos resultados parecen indicar que la mayoría de la reparación del hueso se completó a las seis semanas de producirse el traumatismo inicial, disminuyendo la regeneración de hueso a partir de las

ocho semanas, posiblemente debido a un agotamiento de las células progenitoras alrededor del defecto de hueso que son capaces de diferenciarse a osteoblastos.

El dispositivo PA 400 fue el que tuvo un mayor porcentaje de crecimiento óseo tanto a las seis como a las doce semanas, si bien es cierto que las diferencias no fueron estadísticamente significativas, aunque estos datos concordarían más con los de la literatura previa respecto al tamaño adecuado del poro para el correcto crecimiento óseo intraimplantario.

El no disponer de un estudio SPECT-CT previo a las seis semanas, y la dificultad para la correcta valoración del crecimiento óseo en el interior de los implantes debido al artefacto, creemos que justifican estos resultados similares a las seis y a las doce semanas.

La otra variable estudiada en el SPECT-CT se trató del hueso periimplantario que se formó, esta se definió como Volumen de hueso externo (VHE). En este caso tampoco se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el tipo de implante utilizado, ni tampoco en la diferencia en el tiempo de medición entre las seis y las doce semanas, aunque en este caso el implante PA 600 fue el que tuvo un mejor comportamiento, presentando un mayor crecimiento óseo periimplantario tanto a las seis como a las doce semanas, entendemos que el motivo de la ausencia de diferencias en las dos mediciones coincide con la desarrollada para el VTH.

Los resultados fueron similares a otros estudios *in vivo* realizados con implantes porosos de titanio mediante distintas técnicas de manufactura aditiva (H. Do Jung y cols., 2015; Van Der Stok y cols., 2013) aunque la medición del porcentaje de ocupación de hueso en el implante realizado en otros estudios no nos fue posible llevarlo a cabo, al existir artefacto radiológico frente a otros estudios que defienden como una de las principales ventajas de estos tipos de implantes de titanio la ausencia de artefactos en los estudios de tomografía (Ito y cols., 2014). H. Do Jung estudia las aplicaciones ortopédicas de unos implantes porosos de titanio fabricados por dynamic freeze casting con y sin recubrimiento con rhBMP-2, implantados en calota de conejo neozelandés. En su estudio la muestra con mejores resultados a las seis semanas es la que presenta recubrimiento con rhBMP2 con un volumen de hueso intraimplantario (variable similar a nuestro VHT) valorado con microCT de $9.6 \pm 3 \text{ mm}^3$. En nuestro

estudio el mejor comportamiento a las seis semanas lo presentó PA 400 con 163 mm³, aunque hay que mencionar que la forma del implante desarrollado por ellos era un implante en forma de anillo y al no presentar un área central explica estas diferencias en el volumen.

Van der Stock estudió el comportamiento de implantes porosos de titanio desarrollados por SLM en defectos en segmentos femorales de conejo. Para ello compara distintos recubrimientos con rhBMP-2 y/o FGF-2, de estas muestras la que mejores datos presento en el volumen óseo total a las 12 semanas fue la que tuvo un recubrimiento combinado con rhBMP-2 y/o FGF-2, con 47 mm³. Comparado con nuestro estudio la muestra con mejor comportamiento a las 12 semanas fue PA 400 con un VHT de 155 mm³, y en este caso el implante si que era más similar morfológicamente al nuestro que el del estudio de H. Do Jung, aunque resaltar que nuestro modelo no estaba sometido a cargas mecánicas.

Tras el tratamiento histológico de las muestras en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), a través de la técnica EXAKT, todos los bloques fueron estudiados por un único anatomopatólogo, que estudió el porcentaje de ocupación de hueso del implante y el crecimiento periimplantario.

El análisis histopatológico de las muestras reveló la presencia de neovascularización y la penetración de osteoblastos y osteoclastos en el interior de los implantes, con la consecuente neoformación de hueso en el interior de los implantes. El crecimiento óseo y la formación de una red vascular en el interior de los poros va a resultar en una mayor fijación en comparación con los implantes clásicos. Por otro lado según los estudios de Ito (Ito y cols., 2014), las estructuras porosas de titanio tienen menos tendencia a infectarse que las estructuras macizas del mismo material con tratamiento de superficie, esto diferencia a las estructuras porosas de los implantes clásicos donde el hueso solo crece en su superficie. Esta alta neovascularización va a conllevar una mayor respuesta inmune y descender las tasas de inflamación e infección.

Respecto al porcentaje de crecimiento de hueso intraimplantario valorado mediante microscopía óptica, se objetivó que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) según el tipo de implante, ni tampoco en el tiempo de medición (a las seis y doce semanas). Igualmente, a pesar de no presentar diferencias

estadísticamente significativas, la muestra que presentó una mejor media de crecimiento óseo intraimplantario a las doce semanas frente al resto fue la muestra PA 600, lo cual coincide con los datos obtenidos en el SPECT-CT, mientras que la muestra con una mejor respuesta inicial a las seis semanas fue PR 800.

Los datos de crecimiento óseo implantario fueron similares a los de otros estudios con modelo de calota de conejo como el de De Wild (De Wild y cols., 2013), el cual estudiaba el uso de implantes de titanio grado II desarrollados con técnica de SLM. En su estudio el único implante que presentó diferencias estadísticamente significativas en el recubrimiento del defecto crítico frente a no reponer implante a las ocho semanas fue el que tuvo un tratamiento de superficie, cuyo porcentaje de defecto cubierto fue de $96.67\% \pm 7.46\%$. En nuestro caso el implante con una mejor respuesta a las doce semanas fue PA 600 con un 77,6%. En el estudio de Jia (Lv y cols., 2015) como ya se ha explicado previamente se usaron unos implantes desarrollados por EBM con un tamaño de poro de $640\ \mu\text{m}$ que se insertaron en un defecto medial de cóndilo femoral. En este estudio, la mayor área de nuevo hueso formado lo presentó el implante con BMP con un $27.7 \pm 4.7\%$, bastante inferior a nuestros resultados.

Como conclusiones del estudio *in vivo* evidenciamos que los tres tipos de muestras (PA 400, PA 600 y PR 800) son citocompatibles ya que todas ellas presentaron correcta integración ósea y no tuvieron signos de rechazo en las mediciones repetidas a lo largo del tiempo que se hicieron.

Prácticamente no existen diferencias entre las muestras respecto al VHT, pero respecto al crecimiento óseo periimplantario la muestra PA 600 fue la que presentó un mejor comportamiento a largo plazo, aunque estas diferencias no fueron suficientes para llegar a ser estadísticamente significativas.

Tras finalizar ambos estudios podemos concluir que nuestros dispositivos presentan varias de las cualidades óptimas que se buscan en un biomaterial. En primer lugar, se trata de un **material biocompatible**, ya que no existió rechazo en ninguna de las muestras implantadas en calota de conejo. Esto era esperable, ya que la biocompatibilidad del titanio está ampliamente demostrada, siendo uno de los principales metales utilizados como biomaterial. El titanio presenta gran facilidad para establecer una conexión directa, estructural y funcional, entre el hueso y la superficie

del implante. Las leves reacciones que provoca en el medio biológico y sus adecuadas propiedades mecánicas son los factores determinantes para que sea el material por excelencia en la selección para la fabricación de múltiples tipos de implantes.

Por otro lado, **los implantes desarrollados reproducen la naturaleza porosa del hueso**. Lo interesante del reemplazo de huesos por biomateriales es que este realice las mismas funciones que desarrollaba el hueso original, es decir, que el resto de los tejidos que estarán alrededor del implante no se vean afectados. Es por ello fundamental que las propiedades mecánicas del implante sean lo más similares a las del hueso repuesto.

En nuestro estudio **el módulo de Young y la resistencia a la compresión de nuestros implantes fue muy cercana a la del hueso esponjoso**, mostrando un correcto crecimiento periimplantario. El crecimiento periimplantario alrededor del implante demostrado en la medición del VHE con SPECT-CT y en la visión directa a microscopio de las muestras del estudio *in vivo* completando el gap lateral, indica una buena osteointegración y permite plantearnos estos dispositivos como buenas alternativas para evitar la resorción ósea asociada a los implantes clásicos. Si bien hay que aclarar que en nuestro caso el modelo de animal desarrollado para el estudio del implante no es buen modelo para valorar los efectos a largo plazo como pueden ser los modelos en cóndilo femoral medial o de sustitución vertebral, ya que en nuestro modelo el implante no soporta cargas. Esta es una limitación de nuestro estudio, que, si bien nos aporta datos iniciales del comportamiento del implante, es necesario hacer estudios en otras localizaciones para valorar el comportamiento cuando es sometido a cargas. Cabe aclarar que no utilizamos un modelo con carga soportada al no ser la intención de este estudio valorar los resultados a largo plazo, sino demostrar el crecimiento de hueso intraimplantario.

La porosidad de nuestros dispositivos permitió la adhesión a las células osteogénicas y el crecimiento celular, como se demostró con las imágenes de fluorescencia a microscopio óptico, donde se pudo objetivar una correcta adhesión de las células cultivadas a la superficie del implante y una correcta proliferación celular en el interior de los poros del implante. También en la tinción del citoesqueleto con inmunocitoquímica directa se pudo valorar la presencia de adhesión celular en el interior de los poros.

En las imágenes a microscopía electrónica (SEM) no solo se objetivó la adhesión celular, sino también el crecimiento celular en el interior de los poros, evidenciando la formación de puentes celulares en el interior de los implantes. También en el estudio anatomopatológico se demostró el crecimiento celular dentro del implante, y también de vasos a través de él, favoreciendo una mejor organización del crecimiento celular, así como la creación de una matriz extracelular. Estos resultados confirman nuestra hipótesis de que **nuestros implantes porosos de titanio desarrollados por robocasting pueden proveer un buen soporte mecánico en estadios tempranos para facilitar la formación de hueso**, resultando en buenos resultados de osificación en el interior de los implantes a la retirada a las doce semanas.

Respecto a la porosidad óptima, a pesar de nuestro estudio, sigue siendo un objeto a debate. Parece estar establecido que la mínima porosidad necesaria para que exista un correcto crecimiento celular, en condiciones de carga, es de 200 μm , ya que por debajo de este tamaño disminuye la aportación de oxígeno y la difusión de los nutrientes a través del dispositivo (Van Der Stok y cols., 2013), en nuestro caso ninguno de los implantes presenta diferencias estadísticamente significativas a los otros respecto al crecimiento óseo, si bien los implantes PR 800 con un espaciado de 800 μm y sobre todo PA 600 con un espaciado de 600 μm fueron los que mejor respuesta presentaron a la adhesión celular en el estudio *in vitro* y en el estudio *in vivo* al porcentaje de crecimiento óseo intraimplantario, tanto en el SPECT-CT como en el estudio anatomopatológico.

De todas maneras, con un tamaño mayor del poro, la fuerza del implante se ve significativamente disminuida, en nuestro caso los implantes al estudio de compresión mecánica tuvieron una resistencia a la compresión de aproximadamente 70 MPa, si bien como se ha comentado previamente, en otros modelos con carga soportada los implantes presentaron una resistencia a la compresión similar a la de nuestros implantes (De Wild y cols., 2013; H. Do Young., 2015).

Uno de los principales objetivos de esta tesis era disponer de la presencia de señales morfogenéticas que diferencien a las células progenitoras del huésped en células de linaje óseo, tratando de valorar la formación de hueso ectópico en localizaciones donde no existen células óseas, por ejemplo músculo, la ausencia de un sistema de liberación

que actuará correctamente nos llevo a desechar esta opción de cara al estudio *in vivo*, sabiendo que esta demostrado que la adhesión de BMP-2 mejora la diferenciación ósea, incluso en implantes microporosos por otros estudios (Lv y cols., 2015).

Uno de los principales problemas que tuvo nuestro estudio fue la falta de adhesión de proteínas rhBMP-2 al implante, por la falta de adhesión del film de quitosano que iba a actuar como sistema de liberación controlada, lo cual explica la ausencia de diferencias en el estudio *in vitro* entre los implantes con BMP2 y los que no la tenían.

El obtener otro sistema de liberación para valorar el crecimiento óseo ectópico en localizaciones donde no existen células óseas continuará siendo uno de los objetivos del grupo en futuros estudios.

Por último, y no menos importante, el posible ahorro que suponen estás técnicas frente a los métodos convencionales de producción, permitiendo también la personalización de los dispositivos a los defectos que queremos reparar. Una de las grandes ventajas de las técnicas de manufactura aditiva es la rapidez en su procesamiento, al no necesitar moldes sacrificables o retirada del material sobrenadante, y el ahorro de recursos frente a los métodos tradicionales de fabricación.

Industrialmente, el uso de este tipo de técnicas reduce extraordinariamente los plazos de fabricación de nuevos productos, al permitir que los cambios en el diseño de piezas puedan implementarse de forma inmediata en el proceso productivo, reduciendo a la vez los costes de mecanizado y de materia prima y/o recortes. Esto implica un menor impacto ambiental y un buen equilibrio económico (Chia & Wu, 2015).

Las técnicas de manufactura aditiva han experimentado una gran popularidad en la última década convirtiéndose en una nueva tendencia. Se han desarrollado máquinas de impresión específicas para hogares, escuelas o pequeños negocios, con un menor coste y complejidad que las grandes máquinas usadas a nivel industrial. Por otro lado, el menor coste de las pruebas de imagen como la TC, que hoy en día se encuentra disponible fuera de los grandes hospitales, junto a la disposición de programas de diseño CAD gratuitos han permitido que muchos particulares tengan la opción de poder desarrollar estos modelos y fabricarlos por su cuenta.

La técnica de robocasting combina las cualidades de la pulvimetalurgia (bajo coste, simplicidad y flexibilidad en la selección de componentes) con las cualidades del moldeo por inyección (capacidad para fabricar componentes con estructuras complejas y una rápida producción). Esta combinación, junto a los resultados de esta tesis, hacen que el robocasting sea una técnica de manufactura atractiva y económica para el desarrollo de implantes biomédicos.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. En los estudios *in vitro* los tres tipos de implantes fueron citocompatibles. Todos ellos presentaron aumento de la actividad celular y no tuvieron signos de citotoxicidad en las mediciones repetidas a lo largo del tiempo que se hicieron.
2. Prácticamente no existen diferencias entre las muestras, pero se observa que los implantes PA600 y PR800 mejoran ligeramente o facilitan la adherencia y proliferación celular tanto de las células C2C12 como de los osteoblastos MC3T3E1, con y sin proteína BMP2. En ambas líneas celulares, se observa como rasgo común los menores valores de adherencia y proliferación celular en la muestra PA400.
3. Se evidenció que el recubrimiento de quitosano con BMP2 no fue efectivo en los cultivos, ya que cuando se activaron las proteínas éstas no se adhirieron a la superficie, y en contacto con el medio se despegaron del film de quitosano, perdiéndose la proteína que iba en él. Esto justifica el que no existan apenas diferencias entre las muestras activadas con BMP2 y las que no lo estaban.
4. En el estudio *in vivo* evidenciamos que los tres tipos de muestras son citocompatibles, ya que todas ellas presentaron correcta integración ósea y no tuvieron signos de rechazo en las mediciones repetidas a lo largo del tiempo que se hicieron.
5. No existen diferencias entre las muestras respecto al volumen de hueso total, pero respecto al crecimiento óseo perimplantario, la muestra PA 600 fue la que presentó un mejor comportamiento a largo plazo, aunque estas diferencias no fueron suficientes para llegar a ser estadísticamente significativas.
6. El crecimiento perimplantario alrededor del implante demostrado en la medición del volumen de hueso externo y en la visión directa a microscopio de las muestras del estudio *in vivo*, indica una buena osteointegración y permite plantearnos estos dispositivos como buenas alternativas para evitar la resorción

ósea asociada a los implantes clásicos, aunque para ello haría falta un estudio a largo plazo donde los implantes fueran sometidos a cargas soportadas.

7. Los implantes porosos de titanio estudiados en esta tesis han demostrado ser unos implantes validos para permitir el crecimiento óseo y vascular en su interior. Se necesitan más estudios para demostrar la implementación segura de estos tipos de implantes en seres humanos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abarrategi, A., Civantos, A., Ramos, V., Sanz Casado, J. V., & López-Lacomba, J. L. (2008). Chitosan film as rhBMP2 carrier: Delivery properties for bone tissue application. *Biomacromolecules*, 9(2), 711–718. <https://doi.org/10.1021/bm701049g>
- Amin Yavari, S., van der Stok, J., Chai, Y. C., Wauthle, R., Tahmasebi Birgani, Z., Habibovic, P., Zadpoor, A. A. (2014). Bone regeneration performance of surface-treated porous titanium. *Biomaterials*, 35(24), 6172–6181. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.054>
- Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 40(5), 363–408. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23339648> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3766369>
- Aubin, J. E. (2001). Regulation of osteoblast formation and function. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2(1), 81–94.
- Banhart, J. (2000). Manufacturing Routes for very low specific. *Jom*, 52(December), 22–27. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5018-12.2013>
- Becker, J., Kirsch, A., Schwarz, F., Chatzinikolaidou, M., Rothamel, D., Lekovic, V., & Jennissen, H. P. (2006). Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs. *Clinical Oral Investigations*, 10(3), 217–224. <https://doi.org/10.1007/s00784-006-0049-0>
- Bedogni, A., Fedele, S., Bedogni, G., Scoletta, M., Favia, G., Colella, G., Campisi, G. (2014). Staging of osteonecrosis of the jaw requires computed tomography for accurate definition of the extent of bony disease. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 52(7), 603–608. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2014.04.009>
- Bobyn, J. D., Glassman, A. H., Goto, H., Krygier, J. J., Miller, J. E., & Brooks, C. E. (1990). The effect of stem stiffness on femoral bone resorption after canine porous-coated total hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (261), 196–213.
- Bobyn, J. D., Mortimer, E. S., Glassman, A. H., Engh, C. A., Miller, J. E., & Brooks, C. E. (1992). Producing and avoiding stress shielding. Laboratory and clinical observations of noncemented total hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (274), 79–96.
- Bose, S., Vahabzadeh, S., & Bandyopadhyay, A. (2013). Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today*, 16(12), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.11.017>
- Braddock, M., Houston, P., Campbell, C., & Ashcroft, P. (2001). Born again bone: tissue engineering for bone repair. *News in Physiological Sciences : An International*

Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society, 16, 208–213.

Bram, M., Stiller, C., Buchkremer, H. P., Stöver, D., & Baur, H. (2000). High-Porosity Titanium, Stainless Steel, and Superalloy Parts. *Advanced Engineering Materials*, 2(4), 196–199. [https://doi.org/doi:10.1002/\(SICI\)1527-2648\(200004\)2:4<196::AID-ADEM196>3.0.CO;2-K](https://doi.org/doi:10.1002/(SICI)1527-2648(200004)2:4<196::AID-ADEM196>3.0.CO;2-K)

Branemark, P. I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B. O., Lindstrom, J., & Ohlsson, A. (1969). Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, 3(2), 81–100.

Branemark, P. I., Breine, U., Hallen, O., Hanson, B., & Lindstrom, J. (1970). Repair of defects in mandible. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, 4(2), 100–108.

Brie, I. C., Soritau, O., Dirzu, N., Berce, C., Vulpoi, A., Popa, C., Cernea, V. (2014). Comparative in vitro study regarding the biocompatibility of titanium-base composites infiltrated with hydroxyapatite or silicatitanate. *Journal of Biological Engineering*, 8(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-8-14>

Caicoya, S. O. (2007). *Relleno de cavidades óseas en cirugía maxilofacial con materiales aloplásticos Bone cavity filling with alloplastic material in maxillofacial surgery. 1*, 21–32.

Calori, G. M., Colombo, M., Mazza, E. L., Mazzola, S., Malagoli, E., & Mineo, G. V. (2014). Incidence of donor site morbidity following harvesting from iliac crest or RIA graft. *Injury*, 45 Suppl 6, S116–20. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2014.10.034>

Cameron, H. U., Macnab, I., & Pilliar, R. M. (1978). A porous metal system for joint replacement surgery. *The International Journal of Artificial Organs*, 1(2), 104–109.

Carre A, Lacarriere V. How substrate properties control cell adhesion. A physical–chemical approach. *J Adhes Sci Technol*. 2010; 24:815–830.

Charnley, J. (1961). Arthroplasty of the hip. A new operation. *Lancet (London, England)*, 1(7187), 1129–1132.

Charnley, J. (1972). The long-term results of low-friction arthroplasty of the hip performed as a primary intervention. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 54(1), 61–76.

Cheng, A., Cohen, D. J., Kahn, A., Clohessy, R. M., Sahingur, K., Newton, J. B., Schwartz, Z. (2017). Laser Sintered Porous Ti–6Al–4V Implants Stimulate Vertical Bone Growth. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(8), 2025–2035. <https://doi.org/10.1007/s10439-017-1831-7>

Cheng, A., Humayun, A., Cohen, D. J., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (2014). Additively manufactured 3D porous Ti–6Al–4V constructs mimic trabecular bone structure and regulate osteoblast proliferation, differentiation and local factor production in a porosity and surface roughness dependent manner. *Biofabrication*, 6(4). <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/4/045007>

Chia, H. N., & Wu, B. M. (2015). *Recent advances in 3D printing of biomaterials*. 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13036-015-0001-4>

- Cowan, C. M., Soo, C., Ting, K., & Wu, B. (2005). Evolving Concepts in Bone Tissue Engineering. *Current Topics in Developmental Biology*, 66, 239–285.
[https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)66008-5](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)66008-5)
- Crowninshield, R. D. (1986). Mechanical properties of porous metal total hip prostheses. *Instructional Course Lectures*, 35, 144–148.
- De Peppo, G. M., Palmquist, A., Borchardt, P., Lennerås, M., Hyllner, J., Snis, A., Karlsson, C. (2012). Free-Form-Fabricated Commercially Pure Ti and Ti6Al4V Porous Scaffolds Support the Growth of Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesodermal Progenitors. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–14.
<https://doi.org/10.1100/2012/646417>
- De Wild, M., Schumacher, R., Mayer, K., Schkommodau, E., Thoma, D., Bredell, M., Weber, F. E. (2013). Bone Regeneration by the Osteoconductivity of Porous Titanium Implants Manufactured by Selective Laser Melting: A Histological and Micro Computed Tomography Study in the Rabbit. *Tissue Engineering Part A*, 19(23–24), 2645–2654. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0753>
- Degischer, H. P., & Kriszt, B. (2002). Handbook of Cellular Metals - Production, Processing, Applications. In *Handbook of Cellular Metals*.
https://doi.org/10.1002/3527600558.fmatter_indsb
- Dimitriou, R., Mataliotakis, G. I., Angoules, A. G., Kanakaris, N. K., & Giannoudis, P. V. (2011). Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury*, 42 Suppl 2, S3-15.
<https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.015>
- Duan, B., Wang, M., Zhou, W. Y., Cheung, W. L., Li, Z. Y., & Lu, W. W. (2010). Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 6(12), 4495–4505.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.06.024>
- Frazier, W. E. (2014). *Metal Additive Manufacturing : A Review*. 23(June), 1917–1928.
<https://doi.org/10.1007/s11665-014-0958-z>
- Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luria, E. A., & Ruadkow, I. A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology*, 2(2), 83–92.
- Frost & Sullivan. (2014). Global Additive Manufacturing Market, Forecast to 2025. *Statista GmbH*, (May). Retrieved from
<http://www.statista.com/statistics/284863/additive-manufacturing-projected-global-market-size/>
- Frost, H. M. (1991). A new direction for osteoporosis research: a review and proposal. *Bone*, 12(6), 429–437.
- Fu, Q. (2011). Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 31(October), 1245–1256.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.04.022>.Bioactive

- Goodridge, R. D., Dalgarno, K. W., & Wood, D. J. (2006). Indirect selective laser sintering of an apatite-mullite glass-ceramic for potential use in bone replacement applications. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in Medicine*, 220(1), 57–68. <https://doi.org/10.1243/095441105X69051>
- Gratson, G. M., García-Santamaría, F., Lousse, V., Xu, M., Fan, S., Lewis, J. A., & Braun, P. V. (2006). Direct-Write Assembly of Three-Dimensional Photonic Crystals: Conversion of Polymer Scaffolds to Silicon Hollow-Woodpile Structures. *Advanced Materials*, 18(4), 461–465. <https://doi.org/10.1002/adma.200501447>
- Guo, Z., Iku, S., Mu, L., Wang, Y., Shima, T., Seki, Y., ... Kuboki, Y. (2013). Implantation with new three-dimensional porous titanium web for treatment of parietal bone defect in rabbit. *Artificial Organs*, 37(7), 623–628. <https://doi.org/10.1111/aor.12058>
- Habijan, T., Haberland, C., Meier, H., Frenzel, J., Wittsiepe, J., Wuwer, C., Köller, M. (2013). The biocompatibility of dense and porous Nickel-Titanium produced by selective laser melting. *Materials Science and Engineering C*, 33(1), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.008>
- Hartgerink, J. D., Beniash, E., & Stupp, S. I. (2001). Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science*, 294(5547), 1684–1688. <https://doi.org/10.1126/science.1063187>
- Head, W. C., Bauk, D. J., & Emerson, R. H. J. (1995). Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (311), 85–90.
- Hills, G., Dennis, R., Park, B., & Wayne, A. (1993). *United States Patent (19)*. (19).
- Hirota, M., Hayakawa, T., Yoshinari, M., Ametani, A., Shima, T., Monden, Y., Tohnai, I. (2012). Hydroxyapatite coating for titanium fibre mesh scaffold enhances osteoblast activity and bone tissue formation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 41(10), 1304–1309. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2011.12.035>
- Hoffmann, W., Bormann, T., Rossi, A., Müller, B., Schumacher, R., Martin, I., Wendt, D. (2014). Rapid prototyped porous nickel–titanium scaffolds as bone substitutes. *Journal of Tissue Engineering*, 5. <https://doi.org/10.1177/2041731414540674>
- Hrabe, N. W., Heinl, P., Bordia, R. K., Körner, C., & Fernandes, R. J. (2013). Maintenance of a bone collagen phenotype by osteoblast-like cells in 3D periodic porous titanium (Ti-6Al-4 V) structures fabricated by selective electron beam melting. *Connective Tissue Research*, 54(6), 351–360. <https://doi.org/10.3109/03008207.2013.822864>
- Hwang, J. J., Iyer, S. N., Li, L.-S., Claussen, R., Harrington, D. A., & Stupp, S. I. (2002). Self-assembling biomaterials: Liquid crystal phases of cholesteryl oligo(L-lactic acid) and their interactions with cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 9662–9667. <https://doi.org/10.1073/pnas.152667399>
- Imwinkelried, T. (2007). Mechanical properties of open-pore titanium foam. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 81(4), 964–970. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31118>

- Itälä, A. I., Ylänen, H. O., Ekholm, C., Karlsson, K. H., & Aro, H. T. (2001). Pore diameter of more than 100 μm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research*, 58(6), 679–683. <https://doi.org/10.1002/jbm.1069>
- Ito, K., Horiuchi, T., Arai, Y., Kawahara, I., & Hongo, K. (2014). Histological, mechanical, and radiological study of osteoformation in titanium foam implants. *Acta Neurochirurgica*, 156(11), 2165–2172. <https://doi.org/10.1007/s00701-014-2122-9>
- J, R., E, S., & Deville S. (2006). Fabrication and in vitro characterization of three-dimensional organic/inorganic scaffolds by robocasting. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 79(4), 989–998. <https://doi.org/10.1002/jbm.a>
- Jamróz, W., Szafraniec, J., Kurek, M., & Jachowicz, R. (2018). *3D Printing in Pharmaceutical and Medical Applications – Recent Achievements and Challenges*.
- Jung, H. Do, Jang, T. S., Wang, L., Kim, H. E., Koh, Y. H., & Song, J. (2015). Novel strategy for mechanically tunable and bioactive metal implants. *Biomaterials*, 37, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.027>
- Jung, H. Do, Yook, S. W., Han, C. M., Jang, T. S., Kim, H. E., Koh, Y. H., & Estrin, Y. (2014). Highly aligned porous Ti scaffold coated with bone morphogenetic protein-loaded silica/chitosan hybrid for enhanced bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 102(5), 913–921. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33072>
- Jung, H.-D., Koh, Y.-H., Kim, H.-E., Shin, K.-H., Estrin, Y., Park, C.-H., & Yook, S.-W. (2012). Reverse freeze casting: A new method for fabricating highly porous titanium scaffolds with aligned large pores. *Acta Biomaterialia*, 8(6), 2401–2410. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.020>
- Kademani, D., & Keller, E. (2006). Iliac Crest Grafting for Mandibular Reconstruction. *Atlas of the Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 14(2), 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.cxom.2006.05.005>
- Kato, K., Ochiai, S., Yamamoto, A., Daigo, Y., Honma, K., Matano, S., & Omori, K. (2013). Novel multilayer Ti foam with cortical bone strength and cytocompatibility. *Acta Biomaterialia*, 9(3), 5802–5809. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.018>
- Khorasani, A., Goldberg, M., Doeven, E., & Littlefair, G. (2015). Titanium in Biomedical Applications—Properties and Fabrication: A Review. In *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* (Vol. 5). <https://doi.org/10.1166/jbt.2015.1361>
- Kohn, D. H., & Ducheyne, P. (1990). A parametric study of the factors affecting the fatigue strength of porous coated Ti-6Al-4V implant alloy. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24(11), 1483–1501. <https://doi.org/10.1002/jbm.820241106>
- Kramer, I. R., Killey, H. C., & Wright, H. C. (1968). A histological and radiological comparison of the healing of defects in the rabbit calvarium with and without implanted heterogeneous anorganic bone. *Archives of Oral Biology*, 13(9), 1095–1106.
- Kruth, J. P., Vleugels, J., Deckers, J., & Shahzad, K. (2012). Isostatic pressing assisted indirect selective laser sintering of alumina components. *Rapid Prototyping Journal*, 18(5), 409–419. <https://doi.org/10.1108/13552541211250409>

- Kuboki, Y., Furusawa, T., Sato, M., Sun, Y., Unuma, H., Abe, S., Sammons, R. (2014). Bone enhancing effect of titanium-binding proteins isolated from bovine bone and implanted into rat calvaria with titanium scaffold. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 24(3), 1539–1548. <https://doi.org/10.3233/BME-140958>
- Lambert, P., Ankem, S., Wyatt, Z., Ferlin, K. M., & Fisher, J. (2013). *Finite element analysis and cellular studies on advanced , controlled porous structures with subsurface continuity in bio-implantable titanium alloys*. 225–234. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34684>
- Lan Levengood, S. K., Polak, S. J., Wheeler, M. B., Maki, A. J., Clark, S. G., Jamison, R. D., & Wagoner Johnson, A. J. (2010). Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*, 31(13), 3552–3563. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.052>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), 920–926.
- Lee, J. W., Kim, J. Y., & Cho, D. (2010). *Solid Free-form Fabrication Technology and Its Application to Bone Tissue Engineering*. 3(2), 85–95.
- Lefebvre, L. P., Banhart, J., & Dunand, D. C. (2008). Porous metals and metallic foams: Current status and recent developments. *Advanced Engineering Materials*, 10(9), 775–787. <https://doi.org/10.1002/adem.200800241>
- Lesaichot, V., Leperlier, D., Viateau, V., Richarme, D., Petite, H., & Sailhan, F. (2011). The influence of Bone Morphogenic Protein-2 on the consolidation phase in a distraction osteogenesis model. *Injury*, 42(12), 1460–1466. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.05.039>
- Li, B., Rong, L., Li, Y., & Gjunter, V. E. (2000). *A recent development in producing porous Ni ± Ti shape memory alloys*. 8, 881–884.
- Li, X., Feng, Y. F., Wang, C. T., Li, G. C., Lei, W., Zhang, Z. Y., & Wang, L. (2012). Evaluation of Biological Properties of Electron Beam Melted Ti6Al4V Implant with Biomimetic Coating In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*, 7(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052049>
- Liu, Xiaoxing, Martin, C. L., Bouvard, D., Di Iorio, S., Laurencin, J., & Delette, G. (2011). Strength of Highly Porous Ceramic Electrodes. *Journal of the American Ceramic Society*, 94(10), 3500–3508. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2011.04669.x>
- Liu, Xuanyong, Chu, P. K., & Ding, C. (2004). Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 47(3), 49–121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mser.2004.11.001>
- Luthringer, B. J. C., Ali, F., Akaichi, H., Feyerabend, F., Ebel, T., & Willumeit, R. (2013). Production, characterisation, and cytocompatibility of porous titanium-based particulate scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(10), 2337–2358. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4989-z>
- Lv, J., Xiu, P., Tan, J., Jia, Z., Cai, H., & Liu, Z. (2015). Enhanced angiogenesis and osteogenesis in critical bone defects by the controlled release of BMP-2 and VEGF:

- Implantation of electron beam melting-fabricated porous Ti 6 Al 4 V scaffolds incorporating growth factor-doped fibrin glue. *Biomedical Materials (Bristol)*, 10(3). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/3/035013>
- Mahomed, N. N., Barrett, J. A., Katz, J. N., Phillips, C. B., Losina, E., Lew, R. A., Baron, J. A. (2003). Rates and outcomes of primary and revision total hip replacement in the United States medicare population. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 85(1), 27–32. <https://doi.org/10.2106/00004623-200301000-00005>
- Manley, M. T., Kotzar, G., Stern, L. S., & Wilde, A. (1987). Effects of repetitive loading on the integrity of porous coatings. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (217), 293–302.
- Melchels, F. P. W., Feijen, J., & Grijpma, D. W. (2010). A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*, 31(24), 6121–6130. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.050>
- Messmer, B. J., Hallman, G. L., Liotta, D., Martin, C., & Cooley, D. A. (1970). Aortic valve replacement: new techniques, hydrodynamics, and clinical results. *Surgery*, 68(6), 1026–1037.
- Miranda, P., Pajares, A., Saiz, E., Tomsia, A. P., & Guiberteau, F. (2008). Mechanical properties of calcium phosphate scaffolds fabricated by robocasting. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 85(1), 218–227. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31587>
- Misch, C. E., Qu, Z., & Bidez, M. W. (1999). Mechanical properties of trabecular bone in the human mandible: implications for dental implant treatment planning and surgical placement. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery : Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 57(6), 700–708.
- Molero, E. (2016). *Aditivos de procesamiento en el conformado de estructuras porosas: relevancia de la sinergia partícula-gel*.
- Muth, J. T., Dixon, P. G., Woish, L., Gibson, L. J., & Lewis, J. A. (2017). Architected cellular ceramics with tailored stiffness via direct foam writing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(8), 1832–1837. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616769114>
- Muwaffak, Z., Goyanes, A., Clark, V., Basit, A. W., Hilton, S. T., & Gaisford, S. (2017). Patient-specific 3D scanned and 3D printed antimicrobial polycaprolactone wound dressings. *International Journal of Pharmaceutics*, 527(1–2), 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.077>
- Nannan GUO, M. C. L. E. U. (n.d.). Additive manufacturing: technology, applications and research needs. *Frontiers of Mechanical Engineering*, Vol. 8, pp. 215–243. Retrieved from <http://journal.hep.com.cn/fme>
- Papachroni, K. K., Karatzas, D. N., Papavassiliou, K. A., Basdra, E. K., & Papavassiliou, A. G. (2009). Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends in Molecular Medicine*, 15(5), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.03.001>

- Pattanayak, D. K., Fukuda, A., Matsushita, T., Takemoto, M., Fujibayashi, S., Sasaki, K., ... Kokubo, T. (2011). Bioactive Ti metal analogous to human cancellous bone: Fabrication by selective laser melting and chemical treatments. *Acta Biomaterialia*, 7(3), 1398–1406. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.09.034>
- Pilitsis, J. G., Lucas, D. R., & Rengachary, S. S. (2002). Bone healing and spinal fusion. *Neurosurgical Focus*, 13(6), e1.
- Pilliar, R. M., Cameron, H. U., Binnington, A. G., Szivek, J., & Macnab, I. (1979). Bone ingrowth and stress shielding with a porous surface coated fracture fixation plate. *Journal of Biomedical Materials Research*, 13(5), 799–810. <https://doi.org/10.1002/jbm.820130510>
- Pivonka, P., & Dunstan, C. R. (2012). Role of mathematical modeling in bone fracture healing. *BoneKEy Reports*, 1, 221. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2012.221>
- Pötschke, J., Berger, C., Richter, H., Scheithauer, U., & Weingarten, S. (n.d.). *Additive Manufacturing of Hardmetals*.
- Pullisaar, H., Reseland, J. E., Haugen, H. J., Brinchmann, J. E., & Ostrup, E. (2014). Simvastatin coating of TiO₂ scaffold induces osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 447(1), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.133>
- Rengachary, S. S. (2002). Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurgical Focus*, 13(6), e2.
- Robertson, D. M., Pierre, L., & Chahal, R. (1976). Preliminary observations of bone ingrowth into porous materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 10(3), 335–344. <https://doi.org/10.1002/jbm.820100304>
- Ruggiero, S. L., Dodson, T. B., Fantasia, J., Goodday, R., Aghaloo, T., Mehrotra, B., & O’Ryan, F. (2014). American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw - 2014 update. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 72(10), 1938–1956. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2014.04.031>
- Ryan, G. E., Pandit, A. S., & Apatsidis, D. P. (2008). Porous titanium scaffolds fabricated using a rapid prototyping and powder metallurgy technique. *Biomaterials*, 29(27), 3625–3635. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.032>
- Ryan, G., Pandit, A., & Apatsidis, D. P. (2006). Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials*, 27(13), 2651–2670. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.12.002>
- Sargeant, T. D., Guler, M. O., Oppenheimer, S. M., Mata, A., Satcher, R. L., Dunand, D. C., & Stupp, S. I. (2008). Hybrid bone implants: Self-assembly of peptide amphiphile nanofibers within porous titanium. *Biomaterials*, 29(2), 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.09.012>
- Sarment, D. P., Al-Shammari, K., & Kazor, C. E. (2003). Stereolithographic surgical templates for placement of dental implants in complex cases. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 23(3), 287–295.
- Scheithauer, U., Pötschke, J., Weingarten, S., Schwarzer, E., Vornberger, A., Moritz, T., & Michaelis, A. (2017). *Droplet-Based Additive Manufacturing of Hard Metal*

Components by Thermoplastic 3D Printing (T3DP). 160, 155–160.

<https://doi.org/10.4416/JCST2016-00104>

Schmitz, J. P., & Hollinger, J. O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (205), 299–308. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3084153>

Sikavitsas, V. I., Temenoff, J. S., & Mikos, A. G. (2001). Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, 22(19), 2581–2593.

Simpson, R. L., Wiria, F. E., Amis, A. A., Chua, C. K., Leong, K. F., Hansen, U. N., Lee, M. W. (2008). Development of a 95/5 poly(L-lactide-co-glycolide)/hydroxylapatite and beta-tricalcium phosphate scaffold as bone replacement material via selective laser sintering. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 84(1), 17–25. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30839>

Smay, J. E., Cesarano, J., & Lewis, J. A. (2002). Colloidal Inks for Directed Assembly of 3-D Periodic Structures. *Langmuir*, 18(14), 5429–5437. <https://doi.org/10.1021/la0257135>

Snelling, D., Williams, C., Suchicital, C., & Druschitz, A. (2017). Binder jetting advanced ceramics for metal-ceramic composite structures. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 92. <https://doi.org/10.1007/s00170-017-0139-y>

Stein, G. S., & Lian, J. B. (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Reviews*, 14(4), 424–442. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-4-424>

Stübinger, S., Mosch, I., Robotti, P., Sidler, M., Klein, K., Ferguson, S. J., & Von Rechenberg, B. (2013). Histological and biomechanical analysis of porous additive manufactured implants made by direct metal laser sintering: A pilot study in sheep. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 101(7), 1154–1163. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32925>

Studart, A. R., Gonzenbach, U. T., Tervoort, E., & Gauckler, L. J. (2006). Processing routes to macroporous ceramics: A review. *Journal of the American Ceramic Society*, 89(6), 1771–1789. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x>

Sychterz, C. J., Topoleski, L. D., Sacco, M., & Engh, C. A. S. (2001). Effect of femoral stiffness on bone remodeling after uncemented arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (389), 218–227.

The morbidity of bone fractures and tumors as well as the expenditure on bone grafts continues to rise in both Asia and Western countries (Mithal et al., 2009; Orthoworld, 2011; 2014). (n.d.).

Thomas, E.D., Lochte, H.L.J., Lu, W.C., & Ferrebee, J.W. (1957). Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 257(11), 491–496. <https://doi.org/10.1056/NEJM195709122571102>

Torres-sanchez C, Mushref FRA Al, Norrito M, Yendall K, Liu Y, Conway PP. The effect of pore size and porosity on mechanical properties and biological response of porous titanium scaffolds. *Mater Sci Eng C* 2017;77:219–228.

Tsiridis, E., Upadhyay, N., & Giannoudis, P. (2007). Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules? *Injury*, 38(SUPPL. 1).
<https://doi.org/10.1016/j.injury.2007.02.006>

U.Müller1*, T. Imwinkelried2, M. Horst3, M. S. and U. G.-H. (2006). DO HUMAN OSTEOBLASTS GROW INTO OPEN-POROUS TITANIUM? *European Cells and Materials*, 11, 8–15. Retrieved from
<http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol011/pdf/v011a02.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/CF4E70FD-7C7B-472A-94D0-25C6FCE35FDB>

Urken K. 2013. Atlas de Colgajos Regionales y Libres para la Reconstrucción de Cabeza y Cuello. Recolección e Inserción De Colgajos. Amolca; Second edición (2013)

Vacanti, J. P., & Vacanti, C. A. (2014). *Chapter 1 - The History and Scope of Tissue Engineering* (R. Lanza, R. Langer, & J. B. T.-P. of T. E. (Fourth E. Vacanti, Eds.)).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00001-X>

Valente, F., Schirotti, G., & Sbrana, A. (2009). Accuracy of computer-aided oral implant surgery: a clinical and radiographic study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 24(2), 234–242.

Van Der Stok, J., Van Der Jagt, O. P., Amin Yavari, S., De Haas, M. F. P., Waarsing, J. H., Jahr, H., Weinans, H. (2013). Selective laser melting-produced porous titanium scaffolds regenerate bone in critical size cortical bone defects. *Journal of Orthopaedic Research*, 31(5), 792–799. <https://doi.org/10.1002/jor.22293>

Warnke, P. H., Douglas, T., Wollny, P., Sherry, E., Steiner, M., Galonska, S., Sivananthan, S. (2009). Rapid prototyping: porous titanium alloy scaffolds produced by selective laser melting for bone tissue engineering. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 15(2), 115–124. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0288>

Wieding, J., Souffrant, R., Mittelmeier, W., & Bader, R. (2013). Finite element analysis on the biomechanical stability of open porous titanium scaffolds for large segmental bone defects under physiological load conditions. *Medical Engineering and Physics*, 35(4), 422–432. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2012.06.006>

Wiemann, M., Jennissen, H. P., Rumpf, H., Winkler, L., Chatzinikolaïdou, M., Schmitz, I., & Bingmann, D. (2002). A reporter-cell assay for the detection of BMP-2 immobilized on porous and nonporous materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62(1), 119–127. <https://doi.org/10.1002/jbm.10251>

Wilkins, K. E. (2005). Principles of fracture remodeling in children. *Injury*, 36(1 SUPPL.), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2004.12.007>

Woodard, J. R., Hildore, A. J., Lan, S. K., Park, C. J., Morgan, A. W., Eurell, J. A. C., Wagoner Johnson, A. J. (2007). The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*, 28(1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.021>

- Wu, S. H., Li, Y., Zhang, Y. Q., Li, X. K., Yuan, C. F., Hao, Y. L., Guo, Z. (2013). Porous Titanium-6 Aluminum-4 Vanadium Cage Has Better Osseointegration and Less Micromotion Than a Poly-Ether-Ether-Ketone Cage in Sheep Vertebral Fusion. *Artificial Organs*, 37(12). <https://doi.org/10.1111/aor.12153>
- Yuan, B., Zhou, S., & Chen, X. (2017). Rapid prototyping technology and its application in bone tissue engineering. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 18(4), 303–315. <https://doi.org/10.1631/jzus.b1600118>
- Yue, S., Pilliar, R. M., & Weatherly, G. C. (1984). The fatigue strength of porous-coated Ti-6%Al-4%V implant alloy. *Journal of Biomedical Materials Research*, 18(9), 1043–1058. <https://doi.org/10.1002/jbm.820180908>
- Zhang, X., Ayers, R. A., Thorne, K., Moore, J. J., & Schowengerdt, F. (2001). Combustion synthesis of porous materials for bone replacement. *Biomedical Sciences Instrumentation*, 37, 463–468.
- Zhang, Xiaoying, & Zhang, Y. (2015). Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(3), 777–782. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0531-x>
- Zhao, Y., & Mazzone, T. (2006). Turning “waste” into gold: identification of novel stem cells from human umbilical cord blood. *Discovery Medicine*, 6(32), 87–89.

